

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Agnieszka Gala-Błądzińska

***Oznaczanie stężenia lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilów (NGAL)
w moczu jako wczesny wskaźnik cukrzycowej choroby nerek
u chorych z cukrzycą typu 2***

Praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Marek Kuźniewski

Praca wykonana w:

1. Katedrze i Klinice Nefrologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum.
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Władysław Sułowicz
2. Kliniknym Szpitalu Wojewódzkim Nr 2 im. Św. Królowej Jadwigi w Rzeszowie.
Kierownik Szpitala: Janusz Solarz

Kraków, 2014

Dziękuję mądrym i życzliwym Osobom,
bez pomocy których nie powstałaby ta praca.

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW.....	6
2. WSTĘP.....	9
2.1. Epidemiologia cukrzycowej choroby nerek.....	9
2.2. Ewolucja definicji uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy.....	9
2.3. Patomechanizm wczesnych zmian morfologicznych w nerkach wywołanych przez cukrzycę typu 2.....	13
2.3.1. Znaczenie zmian w tkance cewkowo-śródmiąższowej w patogenezie cukrzycowej choroby nerek.....	15
2.4. Rola biopskaźników wykrywanych w moczu w diagnostyce cukrzycowej choroby nerek.....	19
2.4.1. Wskaźniki uszkodzenia kłębuszków nerkowych.....	21
2.4.2. Biopskaźniki uszkodzenia cewek nerkowych.....	23
2.4.3. Wskaźniki stresu oksydacyjnego.....	26
2.4.4. Wskaźniki stanu zapalnego.....	27
2.4.5. Białka w moczu specyficzne dla uszkodzenia podocytów.....	30
2.4.6. Proteomika i metabolomika w poszukiwaniu idealnego wskaźnika uszkodzenia nerek w cukrzycy typu 2.....	30
2.5. NGAL - nowoczesny biopskaźnik uszkodzenia nerek.....	31
2.6. Wpływ wielokierunkowego zapobiegania cukrzycowej chorobie nerek u chorych z cukrzycą typu 2.....	37
3. CEL PRACY I HIPOTEZA BADAWCZA.....	42
4. MATERIAŁ i METODY.....	43

4.1. Materiał	43
4.2. Protokół badania	44
4.3. Metodyka badań	46
4.3.1. Ocena ogólna grupy badanej	46
4.3.2. Ocena parametrów klinicznych	47
4.3.2.1. Wskaźnik masy ciała (BMI)	47
4.3.2.2. Wskaźnik filtracji kłębuszkowej eGFR MDRD i CKD-EPI	47
4.3.2.2.1. Szacowanie wskaźnika filtracji kłębuszkowej – aktualne zalecenia u chorych z cukrzycą typu 2	48
4.3.2.3. Wskaźnik albumina/kreatynina w pojedynczej porcji moczu	50
4.3.2.4. Wskaźnik NGAL/kreatynina w pojedynczej porcji moczu	50
4.3.2.5. Ocena pozostałych parametrów klinicznych	50
4.3.3. Badania laboratoryjne	51
4.3.3.1. Metody uzyskiwania i przechowywania materiału do badań	51
4.3.3.2. Metody oznaczania analizowanych parametrów	52
4.3.3.2.1. Analiza moczu i oznaczenia parametrów w moczu	52
4.3.3.2.2. Oznaczanie parametrów biochemicznych	53
4.3.3.2.3. Oznaczanie parametrów hematologicznych	55
4.4. Metody statystyczne	56
5. WYNIKI	57
5.1. Charakterystyka grup oraz różnice między grupą badaną i kontrolną	57
5.2. Ocena czynników modyfikujących stężenie uNGAL oraz wielkość wskaźnika uNGAL/uCr	59

5.3.	Analiza zależności między zmianą stężenia uNGAL i uNGAL/uCr, stężeniem albuminy w moczu oraz UACR.....	63
5.4.	Analiza zależności między zmianą stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr, a czasem trwania i stopniem wyrównania cukrzycy typu 2.....	68
5.5.	Analiza zależności między zmianą stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr a blokadą układu RAA.....	70
5.6.	Analiza zależności między zmianą stężenia NGAL w moczu oraz profilem lipidowym i leczeniem statynami.....	71
5.7.	Niezależne czynniki predykcyjne dla zmiany stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr.....	73
5.8.	Analiza zależności między zmianą stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr a powikłaniami sercowo-naczyniowymi.....	74
6.	DYSKUSJA.....	81
7.	OGRANICZENIA BADANIA.....	91
8.	WNIOSKI.....	92
9.	STRESZCZENIE.....	93
10.	SUMMARY.....	95
11.	PIŚMIENNICTWO.....	97
12.	SPIS TABEL	115
13.	SPIS RYCIN.....	117

1. WYKAZ SKRÓTÓW.

ACEI – (angiotensin-converting-enzyme inhibitor) inhibitor enzymu konwertującego angiotensynę

ACR - (albumin creatinine ratio) wskaźnik albuminy do kreatyniny w dobowej zbiorce moczu

AGEs - (advanced glycation end products) końcowe produkty glikacji białek

AKI – (acute kidney injury) ostre uszkodzenie nerek

ALP – (alkaline phosphatase) fosfataza alkaliczna

ARB – (angiotensin II receptor blocker) bloker receptora dla angiotensyny II

AT1 – receptor dla angiotensyny II

B2KR – (B-2 kinin receptor) receptor 2 dla bradykininy

BMI – (body mass index) wskaźnik masy ciała

CChN – cukrzycowa choroba nerek

CD40 – (cluster of differentiation 40) białko występujące na powierzchni komórek prezentujących antygen

CDK – (cyclin-dependent kinase) kinaza cyklinozależna

CIN – (contrast induced nephropathy) nefropatia indukowana środkiem kontrastowym

CKD-EPI - Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

CKIs – (cyclin-dependent kinase inhibitors) inhibitory cyklu komórkowego

CML – (carboxymethyllysine) karboksymetylizyna

CMIA – (chemiluminescent microparticle immunoassay) chemiluminescencja z mikrocząsteczkami

CRP – (C-reactive protein) białko C-reaktywne

CT – (computed tomography) tomografia komputerowa

DMt2 - (diabetes mellitus type 2) cukrzyca typu 2

DNA – (deoxyribonucleic acid) kwas deoksyrybonukleinowy

eGFR – (estimating glomerular filtration rate) szacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej

eNOS – (endothelial nitric oxide synthase) śródbłonkowa syntaza tlenu azotu

FADH2 – (flavin adenine dinucleotide) dinukleotyd flawino-adeninowy

FSGS - (focal segmental glomerulosclerosis) ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych

GBM – (glomerular basement membrane) błona podstawna kłębuszków nerkowych

GFR – (glomerular filtration rate) wskaźnik filtracji kłębuszkowej

GGT - gamma-glutamyltransferaza

HbA1c - hemoglobina glikowana

HGB - hemoglobina

HIV – (human immunodeficiency virus) ludzki wirus niedoboru odporności

%hypo – odsetek krwinek hipochromicznych

ICAM-1 – (intercellular adhesion molecule -1) wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna-1

IgA – immunoglobulina A

IL – 18 – interleukina 18

IL-6 - interleukina 6

IL-8 – interleukina 8

kDa - Kilodalton

KIM-1 – (kidney injury molecule-1) cząsteczka uszkodzenia nerek typu 1

LDL - (low density lipoprotein) lipoproteina o niskiej gęstości

L-FABP – (liver-type fatty acid binding protein) wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe

MAPK – (mitogen-activated protein kinase) kinaza aktywowana mitogenem

MCP-1 – (monocyte chemoattractant protein-1) białko chemotaktyczne monocytów, CCL2

MCV – (mean corpuscular volume) wskaźnik średniej objętości krwinki czerwonej

MDRD – Modification of Diet in Renal Disease

MMP – (matrix metalloproteinase) metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

mRNA – messenger ribonucleotide acid (matrycowy kwas rybonukleinowy)

NADH - nicotin-amide adenosine dinucleotide (zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego)

NAG - N-acetylo-β -D-glucosaminidaza

NF-κB – (nuclear factor-kappa B) czynnik jądrowy kappa B

NGAL – (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) lipokalina związana z żelatynazą neutrofilii

NKF KDOQI – (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) Amerykańska Narodowa Federacja Chorób Nerek

NO – (nitric oxide) tlenek azotu

NSTEMI – (Non-ST Segment Elevation Myocardial Infarction) zawał serca bez uniesienia odcinka ST

8-OHdG - 8-hydrokso-2-deoksyguanozyna

PChN – przewlekła choroba nerek

PCR – (Protein Creatinine Ratio) wskaźnik białka do kreatyniny w dobowej zbiorce moczu

PTD - Polskie Towarzystwo Diabetologiczne

R² - standaryzowany współczynnik determinacji

RAA – (renin-angiotensin-aldosterone) renina-angiotensyna-aldosteron

RAS – (renin angiotensyn system) układu renina-angiotensyna

RBC – (red blood cell) liczba krwinek czerwonych

RBP – (retinol-binding protein) białko wiążące retinol

ROS – (reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu

STAT-1 – (signal transducer and activator of transcription -1) przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji-1

TG – triglicerydy

TGF-β – (transforming growth factor beta) transformujący czynnik wzrostu beta

TIA – (transient ischemic attack) przemijający atak niedokrwieny

TLRs – (Toll-like receptor) błonowy receptor Toll-like

TNF-α – (tumor necrosis factor - α) czynnik martwicy nowotworów - α

UACR – (Urinary Albumin to Creatinine Ratio) wskaźnik albumina/kreatynina w pojedynczej porcji moczu

uNGAL – stężenie NGAL w pojedynczej porcji moczu

uNGAL/uCr – stosunek stężenia NGAL do kreatyniny w pojedynczej porcji moczu

VEGF – (vascular endothelial growth factor) naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu

WBC – (white blood cells) liczba krwinek białych

2. WSTĘP.

2.1. Epidemiologia cukrzycowej choroby nerek.

Pomimo postępu jaki dokonał się w ciągu ostatnich 20 lat w diagnostyce i leczeniu cukrzycowej choroby nerek (CChN), choroba ta stanowi najczęstszą przyczynę przewlekłej choroby nerek (PChN) i niewydolności nerek w 5 stadium zarówno w USA, jak i na całym świecie. Według raportu opublikowanego w 2012 r. przez United States Renal Data System, chorzy z CChN stanowią blisko 45% chorych leczonych nerkozastępczo [33].

Badania epidemiologiczne prowadzone w Polsce szacują, że na cukrzycę choruje niemal 2 miliony osób, przy czym blisko połowę tych przypadków stanowi cukrzyca nierozpoznawana i nieleczona [190]. Częstość występowania rozpoznanej cukrzycy typu 2 (ang. *diabetes mellitus type 2*, DMt2) ocenia się w Polsce na ok. 1000 000 osób. Zakładając, że jedynie u 20% chorych na DMt2 występuje zwiększone ryzyko rozwoju CChN, zagrożenie tym powikłaniem dotyczy blisko 200 000 osób. U wielu z tych chorych, CChN we wczesnym stadium rozwoju pozostaje więc nierozpoznawana [36]. W Polsce dostępne są jedynie rejestry chorych leczonych nerkozastępczo (np. odsetek pacjentów z cukrzycą leczonych dializami pod koniec 2006 r. wynosił 27,16%) [178]. W obrębie wszystkich przewlekłych nefropatii, najczęstszą przyczyną rozpoczęcia leczenia dializami stanowi właśnie cukrzyca, w dalszej kolejności znajdują się przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (18,57%) oraz nefropatia nadciśnieniowa (14,38%) [178]. CChN zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych oraz zgonu, przy czym liczba powikłań wzrasta w miarę postępu stopnia uszkodzenia nerek. U chorych na DMt2 wydających albuminę w ilości od 30 do 300 mg/dobę odsetek powikłań wynosi ok. 2% rocznie, a po przekroczeniu albuminurii powyżej 300 mg/dobę wzrasta do 3,5%. W przypadku podwyższonego stężenia kreatyniny w surowicy oraz u chorych leczonych nerkozastępczo odsetek ten sięga już 12,1% [138].

2.2. Ewolucja definicji uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy.

Począwszy od lat 80-tych ubiegłego wieku, gdy zaczęto oznaczać wydalanie albuminy w moczu, pojawiły się pojęcia mikroalbuminurii lub wczesnej nefropatii cukrzycowej oraz jawnej nefropatii cukrzycowej. Wówczas też, Mogensen [132] zaproponował podział nefropatii cukrzycowej u chorych na cukrzycę typu 1, który ma obecnie jedynie znaczenie historyczne. Pojęcia zagrażającej i jawnej nefropatii cukrzycowej z czasem zostały również wprowadzone dla chorych z DMt2.

W 2002 roku ukazały się w USA zalecenia Amerykańskiej Narodowej Fundacji Chorób Nerek (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, NKF KDOQI) dotyczące oceny, klasyfikacji i stratyfikacji PChN [143]. Zaletą podjętej przez NKF inicjatywy było sprecyzowanie definicji PChN, którą rozpoznaje się na podstawie dwóch kryteriów tj.:

1. Uszkodzenie nerek utrzymujące się przez 3 miesiące lub dłużej, definiowane jako obecność strukturalnych lub czynnościowych nieprawidłowości nerek, z prawidłową lub zmniejszoną filtracją kłębuszkową, co objawia się bezpośrednią obecnością zmian morfologicznych w narządzie oraz obecnością markerów uszkodzenia nerek, w tym nieprawidłowymi wynikami badań obrazowych [144].
2. Obniżenie filtracji kłębuszkowej $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ przez 3 miesiące lub dłużej, przy obecności bądź braku innych cech uszkodzenia nerek opisanych w punkcie 1 [144].

Tworząc tę klasyfikację, przy ustalaniu stadium PChN wzięto pod uwagę zarówno wielkość filtracji kłębuszkowej, jak i obecność innych markerów wskazujących na uszkodzenie narządu. W zaleceniach NFK podkreślono również, że wczesnym i niezwykle czułym markerem uszkodzenia nerek jest białkomocz. Zdefiniowano więc oba pojęcia: białkomoczu oraz albuminurii.

Określenie białkomocz obejmuje: albuminurię, zwiększone wydalanie innych białek oraz zwiększone całkowite wydalanie białka z moczem. Za prawidłową albuminurię arbitralnie uznano wydalanie poniżej 30 mg albuminy na dobę. „Mikroalbuminurię” rozpoznaje się, gdy wydalanie albuminy mieści się w zakresie 30–300 mg na dobę, natomiast „makroalbuminurię”, gdy wydalanie albuminy przekracza 300 mg na dobę. Ze względu na powszechne trudności z uzyskaniem wiarygodnej dobowej zbiórki moczu zalecono stosowanie oceny nasilenia albuminurii, jako stosunku stężenia albuminy do kreatyniny w przygodnej zbiórce moczu (urinary albumin to creatinine ratio, UACR). Przyjęto wartości odcięcia 30–300 mg/g w przygodnej próbce moczu w przypadku „mikroalbuminurii”, oraz dla „makroalbuminurii” powyżej 300 mg/g, bez względu na płeć [88]. W zleceniach z 2002 r. uznano również, że definicję oraz kryteria rozpoznania PChN można stosować do choroby nerek, której pierwotną przyczyną jest cukrzyca. Jednak rosnąca epidemia DMt2 w populacji światowej, a w konsekwencji zwiększająca się liczba chorych wymagających leczenia nerkozastępczego, skłoniła do sprecyzowania kryteriów diagnostycznych dla tej szczególnej postaci choroby nerek.

W wytycznych KDOQI z 2002r. [143] po raz pierwszy wprowadzono rozpoznanie cukrzycowa choroba nerek, które zastąpiło dotychczasowy termin nefropatia cukrzycowa.

Uznano, także że termin nefropatia cukrzycowa posiada znaczenie historyczne, odzwierciedlając jedynie występowanie białkomoczu u chorego na cukrzycę. Zalecenia opracowane przez grupę roboczą KDOQI wprowadziły pojęcie cukrzycowej choroby nerek (ang. *diabetic kidney disease*, DKD), jako jednej z postaci PChN.

W 2007 roku KDOQI zaleciło, aby albuminurię wyrażoną jako wskaźnik albumina/kreatynina potwierdzać wykonując przynajmniej dwa oznaczenia UACR w pierwszej porannej próbce moczu w ciągu pierwszych 3–6 miesięcy od rozpoznania. W celu potwierdzenia rozpoznania CChN, dwa spośród zalecanych trzech oznaczeń UACR powinny być mieścić się w zakresie „mikroalbuminurii” lub „makroalbuminurii” [88]. Należy pamiętać, że w ocenie albuminurii na zwiększone wydalenie albuminy wpływ mogą mieć również inne czynniki tj.: wysiłek fizyczny w poprzedzających 24 godzinach, zakażenie, gorączka, zastoinowa niewydolność serca, znaczna hiperglikemia, ciąża, czy wysokie wartości ciśnienia tętniczego. W zaleceniach wyraźnie zaakcentowano, że PChN u pacjenta z cukrzycą nie zawsze musi być cukrzycową chorobą nerek i w przypadkach wątpliwych należy przeprowadzić diagnostykę różnicową. Inne przyczyny PChN należy rozważać zwłaszcza, gdy u pacjenta obserwuje się: brak retinopatii cukrzycowej, niskie wartości lub szybko zmniejszający się wskaźnik filtracji kłębuszkowej (ang. *glomerular filtration rate*, GFR), gwałtownie nasilający się białkomocz lub zespół nerczycowy, oporne na leczenie nadciśnienie tętnicze, objawy lub wykładniki innej choroby ogólnoustrojowej, występowanie aktywnego osadu moczu, zmniejszenie GFR >30% w okresie 2–3 miesięcy po rozpoczęciu leczenia inhibitorami konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin-converting-enzyme inhibitor*; ACEI) lub antagonistami receptora angiotensyny (ang. *angiotensin II receptor blocker*; ARB) [95]. W każdej z powyższych okoliczności zalecono przeprowadzenie diagnostyki w kierunku niecukrzycowej choroby nerek, która może współistnieć z DMt2. Według różnych opracowań u chorego z DMt2 częstość występowania lub współistnienia niecukrzycowej choroby nerek może sięgać nawet 30% [88].

Ponadto, nowym elementem zawartym w wytycznych z 2007 roku było określenie prawdopodobieństwa CChN w oparciu o wartość GFR i wielkość albuminurii (Tabela 1) [88].

Tabela 1.

Prawdopodobieństwo wystąpienia CChN na podstawie oceny nasilenia albuminurii i wartości GFR [88].

GFR (ml/min)	Stadium PChN	Albuminuria		
		normoalbuminuria	mikroalbuminuria	makroalbuminuria
>60	1+2	zwiększone ryzyko CChN	możliwa CChN	CChN
30-60	3	mało prawdopodobna CChN	możliwa CChN	CChN
<30	4+5	mało prawdopodobna CChN	mało prawdopodobna CChN	CChN

W celu określenia stadium rozwoju CChN u chorych na DMt2, Polskie Towarzystwo Diabetologiczne (PTD) zaleciło w 2010 roku wykonywanie pomiaru wskaźnika albumina/kreatynina w pojedynczej porcji moczu (ang.: *Urinary Albumin to Creatinine Ratio*, UACR), pomiaru stężenia kreatyniny w surowicy oraz ocenę wielkości przesączania kłębuszkowego (GFR) od momentu rozpoznania cukrzycy [228]. Na podstawie wyników chorzy mogą być kwalifikowani do jednego z 5 stadiów zaawansowania choroby, podobnie jak w innych PChN [143]. Wyróżniono następujące stadia PChN:

- stadium G1 – uszkodzenie nerek z prawidłowym lub podwyższonym GFR (uszkodzenie nerek pod postacią albuminurii, białkomoczu, krwinkomoczu, bądź widoczne w badaniach obrazowych), $GFR \geq 90$ ml/min/1,73 m²
- stadium G2 – uszkodzenie nerek z łagodnym obniżeniem GFR, GFR pomiędzy 60–89 ml/min/1,73 m², określana wcześniej jako utajona przewlekła niewydolność nerek
- stadium G3 – uszkodzenie nerek ze średnim, przez umiarkowane do znacznego obniżenia GFR, GFR pomiędzy 30–59 ml/min/1,73 m², określana wcześniej jako jawna, wyrównana przewlekła niewydolność nerek
- stadium 4 – uszkodzenie nerek ze znacznym obniżeniem GFR, GFR pomiędzy 15–29 ml/min/1,73 m², dawna nazwa – jawna, niewyrównana przewlekła niewydolność nerek
- stadium 5 – niewydolność nerek, $GFR < 15$ ml/min/1,73 m² lub dializa, określana wcześniej jako - schyłkowa niewydolność nerek.

W ujęciu patomorfologicznym CChN definiuje się jako jedno z przewlekłych naczyniowych powikłań cukrzycy, zaliczane do mikroangiopatii, charakteryzujące się początkowo pogrubieniem błony podstawnej włósniczek kłębuszków nerkowych i powiększeniem obszaru mezangium wskutek nagromadzenia macierzy pozakomórkowej, prowadzącym do przerostu kłębuszków i nerek oraz zaburzeń hemodynamiki nerkowej, zwiększonego wydalania albuminy z moczem, a następnie do postępującego, rozlanego lub ogniskowego (guzkowego) stwardnienia kłębuszków nerkowych z rozwojem zmian cewkowo-śródmiąższowych i upośledzeniem czynności nerek [37]. Wadą tej definicji jest wykazanie zmian morfologicznych zachodzących w nerkach wywołanych przez cukrzycę. Tymczasem, u chorych na cukrzycę wskazania do wykonania biopsji są bardzo ograniczone. Z tego powodu przydatność kliniczna tej opisowej definicji CChN jest ograniczona.

2.3. Patomechanizm wczesnych zmian morfologicznych w nerkach wywołanych przez DMt2.

Na rozwój zmian morfologicznych w nerkach w przebiegu cukrzycy wpływ mają zarówno zaburzenia metabolizmu komórek nerkowych wywołane przez podwyższone wartości glikemii, jak również zmiany hemodynamiki nerkowej oraz aktywacja układu renina – angiotensyna - aldosteron (RAA) [199]. Zaburzenia dotyczące kłębuszkowych komórek śródbłonna w cukrzycy, podobnie jak w innych naczyniach organizmu, obejmują proliferację, złuszczenie się, zmianę kształtu oraz zaburzenia odnowy [211]. Hiperglikemia stymuluje wytwarzanie przez komórki kłębuszka nerkowego, naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). W komórkach śródbłonna VEGF za pośrednictwem receptorów prowadzi do nasilenia ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (ang. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) i zwiększenia jego wytwarzania. Pobudzenie komórek śródbłonna przez VEGF ma prawdopodobnie miejsce we wczesnym stadium uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy i może przyczyniać się do hiperfiltracji kłębuszkowej [96].

U chorych na DMt2 znaczenie hiperfiltracji kłębuszkowej jako czynnika ryzyka rozwoju progresywnego uszkodzenia nerek jest kontrowersyjna. Jedną z przyczyn pozostaje wiek chorych, u których rozpoznajemy DMt2. Najczęściej do grupy tej zaliczane są osoby po 40 roku życia. Jeżeli przyjmiemy, że po 20-30 roku życia u zdrowych osób fizjologiczny spadek GFR wynosi 1-2ml/min/1,73m²/rok, większość chorych w chwili rozpoznania DMt2 posiada już wyjściowo znacznie niższe wartości GFR. Utrudnia to więc właściwą ocenę GFR,

a co za tym idzie, również rozpoznanie ewentualnej hiperfiltracji [205]. Ponadto, w materiale biopsyjnym uzyskanym od chorych z DMt2 powikłaną rozwojem CChN wykazano, że aktywacja receptorów VEGF w śródbłonku była zwiększona tylko w nieznacznie uszkodzonych kłębuszkach nerkowych i pozostawała istotnie niższa w kłębuszkach o znacznym uszkodzeniu. Dysfunkcja śródbłonka obserwowana w cukrzycy, której towarzyszy zmniejszona aktywność tlenku azotu stanowi ważny czynnik rozwoju uszkodzenia układu naczyniowego również w nerkach [152]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że za pośrednictwem VEGF dochodzi w przebiegu cukrzycy do nieprawidłowej angiogenezy w kłębuszkach nerkowych [96]. Nieprawidłowa angiogeneza związana jest z tworzeniem nowych włosniczek, które biorą początek po drugim lub trzecim rozgałęzieniu tętniczki doprowadzającej i kończą się łącząc się z naczyniami poza kłębuszkiem, tworząc w ten sposób anastomozy z włosniczkami okołocewkowymi [127]. Wynikiem współdziałania czynników uszkodzających nerki w cukrzycy jest stymulacja wytwarzania macierzy pozakomórkowej przez komórki nerek oraz przerost poszczególnych typów komórek nerkowych. W cukrzycy, w skutek zwiększonego wytwarzania oraz zmniejszonego usuwania białek macierzy pozakomórkowej (obniżona aktywność metaloproteinaz) przez komórki śródbłonka i podocyty, a także komórki mezangialne, upośledzeniu ulega funkcja bariery filtracyjnej błony podstawnej, co objawia się w początkowej fazie zwiększeniem przepuszczalności dla albuminy [86,111]. Przefiltrowana w kłębuszkach nerkowych albumina jest w warunkach fizjologicznych reabsorbowana za pośrednictwem receptorów przez komórki nabłonkowe cewek bliższych na drodze endocytozy. Do receptorów biorących udział w tym procesie należą białka cewek bliższych: megalina i kubulina.

W badaniach doświadczalnych potwierdzono, że niedobór megaliny i kubuliny powoduje kilkakrotne zwiększenie wydalania albuminy w moczu [22]. W wyniku długotrwałego i nadmiernego wychwytu albuminy przez komórki cewek dochodzi do ich uszkodzenia. Możliwe również, że inne substancje przechodzące do moczu pierwotnego przez uszkodzoną barierę filtracyjną kłębuszków nerkowych, mogą prowadzić do uszkodzenia komórek cewkowych i wywoływać stan zapalny oraz proces włóknienia w tkance śródmiąższowej, przyczyniając się tym samym do progresji uszkodzenia nerek [230]. Zwiększone wydalanie albuminy w moczu stanowi więc prosty, wczesny, odwracalny i klinicznie użyteczny wskaźnik uszkodzenia nerek w cukrzycy [88]. Zmiany strukturalne w nerkach wywołane przez DMt2 oraz ich związek z zaburzeniami czynności nerek różnią się znacznie w porównaniu z chorymi na cukrzycę typu 1 [199]. W badaniach przeprowadzonych w Japonii stwierdzono między innymi, że niektórzy chorzy na DMt2 ze zwiększoną

albuminurią lub białkomoczem wykazywali prawidłową strukturę kłębuszków nerkowych [135]. W innym badaniu potwierdzono również znaczne zróżnicowanie w zakresie zmian morfologicznych w nerkach u chorych na DMt2 z towarzyszącą albuminurią i białkomoczem [112]. W badaniach biopsyjnych nerek u chorych na cukrzycę insulinoniezależną (nomenklatura z 1996r.) ze zwiększoną albuminurią wykazano, że struktura nerek była prawidłowa u 30% chorych, natomiast u kolejnych 30% chorych zmiany były podobne do tych stwierdzanych w cukrzycy typu 1 (zmiany w kłębuszkach nerkowych, tkance śródmiąższowej, naczyniach nerkowych). U pozostałych 40% chorych nie wykazano obecności zmian typowych dla cukrzycy insulinoniezależnej, stwierdzono natomiast nieproporcjonalnie nasilone uszkodzenie tkanki cewkowo-śródmiaższowej, zmiany hialinowe w drobnych naczyniach nerkowych lub uogólnione stwardnienie kłębuszków nerkowych. U chorych zakwalifikowanych do tej ostatniej grupy występował większy wskaźnik masy ciała, jednak rzadziej stwierdzano u nich retinopatię proliferacyjną [52].

Według danych pochodzących z Polskiego Rejestru Nefropatii Rozpoznawanych na Podstawie Biopsji Nerek (2009-2012) przedstawionych na XXI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego w 2014 roku, CChN rozpoznawana jest u około 2% chorych poddanych biopsji nerki, przy czym u 60% chorych z DMt2 rozpoznawana jest nefropatia inna niż cukrzycowa [163]. Odsetek ten jest większy w polskim rejestrze z uwagi na małą liczbę badań oceniających zmiany strukturalne w mikroskopie elektronowym. Badania mające na celu dokładne wyjaśnienie przyczyny zróżnicowanych zmian morfologicznych w nerkach u chorych na DMt2 są nadal kontynuowane. Spośród prezentowanych danych zwraca uwagę fakt, że otyłość często poprzedzająca wystąpienie DMt2 wywołuje specyficzną chorobę nerek o niepewnym rokowaniu tj.: ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (ang. *focal segmental glomerulosclerosis*, FSGS) [163]. Dodatkowo, na progresję zmian morfologicznych w CChN, szczególnie u chorych z DMt2, wpływ mają choroby współwystępujące, takie jak: nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia, zaburzenia metaboliczne związane z pogorszeniem funkcji nerek lub ich niewydolnością oraz niedokrwistość [36,46,144].

2.3.1. Znaczenie zmian w tkance cewkowo-śródmiaższowych w patogenezie CChN.

Za CChN w pojęciu morfologicznym uznajemy najczęściej zmiany polegające przede wszystkim na przeroście różnych struktur kłębuszka nerkowego (wzrost przestrzeni mezangialnej, pogrubienie błony podstawnej) oraz uszkodzenia i utraty podocytów, co nieodłącznie wiąże się ze ich stwardnieniem (ang. *nodular glomerulosclerosis* lub

Kimmlesteiel-Wilson nodular disease) [199]. Analiza piśmiennictwa dostarcza przekonujących danych wskazujących, że nie tylko zmiany w kłębuszkach, ale także zmiany w cewkach oraz w tkance śródmiąższowej odgrywają istotną rolę w rozwoju CChN.

Hamowanie cyklu komórkowego.

Przerost poszczególnych struktur kłębuszka nerkowego zależny jest z jednej strony od indukcji cytokin i czynników wzrostowych, a z drugiej od zahamowania cyklu komórkowego, który zależny jest od kinaz cyklinozależnych (ang. *cyclin-dependent kinase*, CDK) i inhibitorów cyklu komórkowego (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitors*, CKIs) [160]. Inhibitory te mogą ulegać zwiększonej ekspresji w cukrzycy, co skutkuje zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G1-S i w konsekwencji prowadzi do przerostu komórkowego lub apoptozy komórkowej. Do zależnego od zatrzymania cyklu komórkowego przerostu dochodzi zarówno w komórkach kłębuszka nerkowego, ale również w komórkach cewek nerkowych. Na skutek tego procesu komórki zmieniają swój fenotyp oraz wrażliwość. Komórki cewek u chorego z cukrzycą poddawane są niekorzystnemu działaniu środowiska hiperglikemicznego, ale również oddziaływaniu filtrowanych białek, cytokin, glikowanych białek i angiotensyny II, co w konsekwencji prowadzi poprzez ścieżki sygnałowe do rozwoju stanu zapalnego w tkance cewkowo-śródmiąższowej, zwiększonej produkcji macierzy pozakomórkowej i transformacji epitelialno-mezenchymalnej komórek cewek nerkowych [160]. W tkance cewkowo-śródmiąższowej na skutek toczącego się zapalenia dochodzi do infiltracji tego obszar przez leukocyty i monocyty, które przekształcając się w makrofagi tkankowe prowadzą do uruchomienia zmian naprawczych oraz indukcji włóknienia. Ten proces staje się przyczyną nieodwracalnego uszkodzenia nerek natomiast CChN należy uznać za chorobę zapalną [73,184].

Hiperfiltracja kłębuszkowa.

Charakterystyczna dla CChN hiperfiltracja kłębuszkowa i zwiększone ciśnienie wewnątrz-kłębuszkowe zależne jest głównie od czynników hemodynamicznych spowodowanych nadmierną produkcją angiotensyny II oraz zwiększoną wrażliwością receptora dla angiotensyny, co w środowisku hiperglikemicznym powoduje zmniejszenie oporu przedkłębuszkowego (prawdopodobnie u osobników do tego predysponowanych) oraz wzrost ciśnienia wewnątrz-kłębuszkowego prowadzący do hiperfiltracji i zwiększonego GFR w początkowym okresie choroby [104]. Hiperfiltracja w cukrzycy może również zależeć od zmian w tkance cewkowo-śródmiąższowej. Zmiany w dopływie ładunku sodu do cewki

dystalnej na zasadzie sprzężenia cewkowo-kłębuszkowego mają wpływ na ciśnienie filtracyjne. Spadek stężenia sodu w okolicy cewki dystalnej uruchamia mechanizm reninowo-angiotensynowy i powoduje obkurczenie tętniczki odprowadzającej skutkujące zwiększeniem filtracji. Z kolei zwiększenie ładunku sodu docierającego do cewki dystalnej skutkuje uwalnianiem adenozyiny, skurczem tętniczki doprowadzającej i spadkiem filtracji kłębuszkowej. W przebiegu cukrzycy, z powodu zwiększonej wrażliwości receptora glukozowego typu drugiego sprzężonego z sodem, dochodzi do nadmiernej reabsorpcji glukozy filtrowanej w nadmiarze oraz jednocześnie nadmiernej reabsorpcji sodu w cewce proksymalnej. Z tego powodu, zmniejszony ładunek sodu dochodzący do cewki dalszej aktywuje układ RAA. Mechanizm hiperfiltracji w cukrzycy jest więc złożony. Stąd u chorych na cukrzycę mówi się o paradoksie sodowym polegającym na zwiększonej reabsorpcji zmniejszonego ładunku sodowego prowadzącego do spadku dopływu sodu do płamki gęstej i w konsekwencji do hiperfiltracji u osób stosujących dietę z ograniczeniem spożycia soli. Z kolei u pacjentów stosujących dietę wysokosodową obserwujemy spadek tej filtracji. Konsekwencją diety niskosodowej w cukrzycy będzie kłębuszkowa hiperfiltracja, która jest niekorzystna dla kłębuszka nerkowego. Z drugiej strony dieta niskosodowa sprzyja raczej obniżeniu ciśnienia tętniczego, co ma korzystny wpływ na rozwój powikłań cukrzycowych. Zagadnienie to jest złożone i wymaga dalszych badań [14,186,197,203].

Glikacja białek.

Zaawansowane produkty glikacji białek (ang. *Advanced Glycation End-Products*, AGEs) takie jak: N-karboksymetylizyna (CML), pentozydyna, pyrwalina i imidazolone znane są już od 1912 r., kiedy to otrzymane zostały przez Louis-Camilla Maillarda w tzw. reakcji Maillarda [116]. AGEs biorą znaczący udział w patomechanizmie CChN. Glikowane białka indukują ścieżki sygnałowe: STAT-1, NF- κ B, kinazy aktywowane mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) poprzez swój receptor (RAGE) i powodują transkrypcję genów kodujących cząsteczki prozapalne takie jak interleukina 8 (IL-8) czy cząsteczka adhezyjna ICAM-1. Cząsteczki te mają istotne znaczenie w rekrutacji oraz chemotaksji leukocytów i monocytów do miejsca zapalenia [191,193]. W inkubowanych z glikowaną albuminą komórkach ludzkich cewek proksymalnych zaobserwowano wyraźne wzmożoną ekspresję zarówno IL-8, jak i cząsteczki adhezyjnej, co dowodzi obecności stanu zapalnego w środowisku cukrzycowym. Zjawisko to może być przynajmniej częściowo zredukowane poprzez dodawanie rosiglitazonu do medium. Końcowe produkty glikacji wydawały się nie

mieć wpływu w tej obserwacji na indukcję takich istotnych prozapalnych cytokin jak interleukina 6 (IL-6), czy czynnik chemotaktyczny monocytów (MCP-1) [189].

Układ bradykininowy.

Istnieją dane literaturowe, które mówią, że środowisko hiperglikemiczne indukuje kalikreinę i sprzyja zwiększonemu tworzeniu bradykininy [189]. W hodowli komórek proksymalnych cewek ludzkich w wysokich stężeniach glukozy, w zależności od wartości tego stężenia dochodzi do indukcji zarówno IL-6, MCP-1, transformującego czynnika wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*, TGF- β), naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i ekspresji receptora 2 dla bradykininy (ang. *B-2 kinin receptor*, B2KR). W tych samych komórkach cewek, ale inkubowanych z bradykininą zaobserwowano również indukcję IL-6, MCP-1 oraz TGF- β . Zablockowanie receptora dla bradykininy powoduje zmniejszenie ekspresji tych czynników [189]. Reasumując należy zauważyć, że zarówno bradykinina, jak i wysokie stężenie glukozy modą sprzyjać uszkodzeniu cewek nerkowych. Wysokie stężenie glukozy stymuluje poprzez kinazy białek C, czynnik śródbłonkowy, który wpływa na proliferację endotelialną, neoangiogenezę i infiltrację makrofagami. W środowisku cukrzycowym bradykinina i jej receptor oraz kinaza białek aktywowana mitogenem, prowadzą do zwiększonej ekspresji IL-6, czynnika chemotaktycznego (ang. *chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL-2) i TGF- β z konsekwencjami w postaci rozwoju zapalenia cewkowo-śródmiąższowego, zwiększonej chemotaksji leukocytów, nasilonego włóknienia i transformacji epitelialno-mezenchymalnej komórek cewek nerkowych [186].

Zwiększona ekspresja receptorów Toll-like.

Kolejny ważny element, który odgrywa rolę w zapaleniu cewkowo-śródmiąższowym to zwiększona ekspresja receptorów błonowych Toll-like (ang. *Toll-like receptors*, TLRs). Są to receptory zaangażowane przede wszystkim w nieswoistą odpowiedź immunologiczną. Mogą one odbierać tzw. *danger signal* w postaci endogennych bodźców takich jak hipoksja, hipoglikemia, czy stres oksydacyjny. Na skutek aktywacji TLRs zarówno na komórkach kłębuszków nerkowych, ale również w cewkach nerkowych, poprzez ścieżki sygnałowe dochodzi do indukcji procesu zapalnego oraz wydzielania cytokin prozapalnych i chemokin, co prowadzi do rozwoju zapalenia i włóknienia cewkowo-śródmiąższowego, ale również stwardnienia kłębuszków nerkowych [108]. Zaobserwowano dodatnią korelację między ekspresją TLRs, a nasileniem nacieczenia tkanki śródmiąższowej poprzez komórki

monocytnie oraz stężeniem hemoglobiny glikowanej, a także odwrotną zależność z GFR. Nie potwierdzono zależności pomiędzy ekspresją TLR4 oraz dobowym białkomoczem [109].

Zjawisko odciętych kłębuszków (ang. atubular glomeruli).

Zjawisko odciętych kłębuszków dotyczy kłębuszków pozbawionych cewek w skutek ich atrofi. Do atrofi cewek nerkowych może dochodzić z powodu ich niedrożności w konsekwencji tworzenia wałeczków, czy obliteracji początkowego odcinka cewki spowodowanej zrostami pętli włosniczkowych z torebką Bowmana [139]. Przyczyną tego zjawiska może być również toksyczny efekt filtrowanych makromolekuł na komórki cewek. Stwierdzono, że u 71% chorych z białkomoczem w cukrzycy typu 1 rozwijają się nieprawidłowości połączenia kłębuszkowo - cewkowego, a blisko 8-17% kłębuszków u tych chorych może być pozbawionych połączenia z zanikłymi cewkami nerkowymi [142].

Badania eksperymentalnego uszkodzenia cewek nerkowych za pomocą adriamycyny wykazały, odłączenie się cewki proksymalnej od kłębuszka nerkowego zapoczątkowane poprzez zrost komórkowy. Stwierdzono również wysoce znaczącą zależność między liczbą kłębuszków pozbawionych cewek oraz obniżoną filtracją kłębuszkową [142].

Na podstawie przedstawionych informacji sugeruje się, że cewkowo-śródmiąższowe uszkodzenie nerek w przebiegu cukrzycy ma znaczący wpływ na progresję CChN [26].

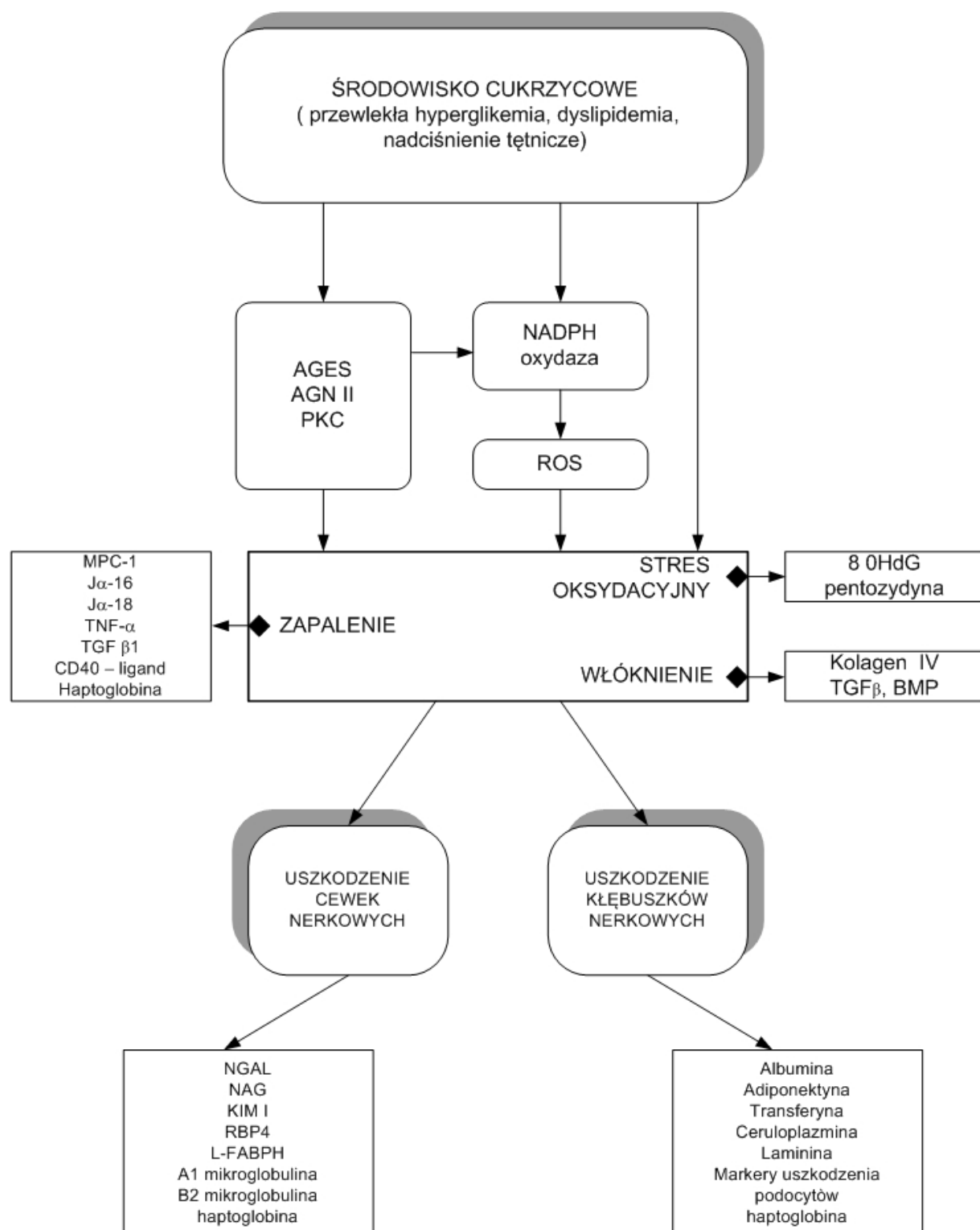
2.4. Rola wskaźników wykrywanych w moczu w diagnostyce CChN.

Z uwagi na złożony patomechanizm zmian w nerkach w przebiegu DMt2 oraz w celu usystematyzowania wiedzy, wskaźniki stosowane w diagnostyce CChN można podzielić na wskaźniki: uszkodzenia kłębuszków nerkowych, uszkodzenia cewek nerkowych, stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego.

Rycina 1 przedstawia rolę poszczególnych wskaźników w patogenezie CChN w przebiegu DMt2.

Rycina 1.

Rola poszczególnych wskaźników w patogenezie CChN w przebiegu DMt2.



2.4.1. Wskaźniki uszkodzenia kłębuszków nerkowych.

Uszkodzenie nerek w cukrzycy charakteryzuje się zmianami w budowie i przepuszczalności błony filtracyjnej kłębuszka nerkowego. Na skutek uszkodzenia bariery filtracyjnej dochodzi do wydalania z moczem białek osocza takich jak: albumina, czy transferyna, które nie są swobodnie filtrowane w zdrowych kłębuszkach nerkowych [123].

Albuminuria.

Albumina jest białkiem o masie cząsteczkowej 65 kDa, filtrowanym w kłębuszkach nerkowych a następnie wchłanianym zwrotnie w cewce proksymalnej nefronu. Albuminuria stanowi więc wypadkową procesu filtracji kłębuszkowej i reabsorpcji. W licznych badaniach prowadzonych jeszcze w poprzednim stuleciu udokumentowano, że zwiększone wydalanie albuminy w moczu pozostaje wczesnym predyktorem progresywnego upośledzenia czynności nerek u chorych na DMt2 i jest w tym typie cukrzycy silniej związana z powikłaniami naczyniowymi i śmiertelnością w porównaniu z cukrzycą typu 1 [40,180]. Obecnie albuminuria stanowi złoty standard w diagnostyce i ocenie zaawansowania CChN [229]. Ciężkość oraz przebieg CChN oceniana na podstawie dobowego wydalania albuminy z moczem może być nazywany „mikroalbuminurią” (30-299mg/24h), „makroalbuminurią” (300mg-3g/24h) lub białkomoczem nerczycowym (>3g/24h). PTD zaleca, aby w celu wykrycia lub oceny stopnia zaawansowania CChN wyliczać wskaźnik UACR, eliminując tym samym błędy powstające przy oznaczeniach albuminurii w dobowej zbiorce moczu. Jednak, u części pacjentów z DMt2, CChN może przebiegać bez wyraźnego zwiększenia lub progresji albuminurii [46]. W literaturze dostępne są długoletnie badania populacyjne, z których wynika, że u blisko 30-38% chorych z DMt2, u których pojawiała się niewydolność nerek nie obserwowano albuminurii [101,172], czy też badania opisujące zaawansowane zmiany histopatologiczne w nerkach pod postacią szkliwienia kłębuszków nerkowych w biopsatach nerek pacjentów z DMt2, u których nie stwierdzano białkomoczu ani tzw. „mikroalbuminurii” [23]. Pojawienie się albuminurii nie powinno więc być traktowane jako marker ryzyka CChN, ale raczej jako wskaźnik uszkodzenia nerek oraz biowskiąznik ryzyka rozwijających się powikłań w przebiegu cukrzycy [41].

Współcześnie toczy się dyskusja dotycząca określenia wielkości albuminurii, którą należy uznać za prawidłową oraz jakie jest znaczenie prognostyczne nieznacznie zwiększonej albuminurii. Należy się spodziewać, że próg albuminurii, który obecnie uważamy za

prawidłowy (<30mg/g kreatyniny w pojedynczej porcji moczu lub <30mg w dobowej zbiorce moczu) zostanie obniżony.

Kolagen typu IV.

Kolagen typu IV jest główną składową błony podstawnej i stanowi strukturalną oraz funkcjonalną podporę różnych komórek (w tym komórek kłębuszka nerkowego i cewek nerkowych), a także wchodzi w skład macierzy mezangium. Jest to białko o dużej masie cząsteczkowej (540 kDa), które nie może zostać przefiltrowane z osocza do moczu pierwotnego w kłębuszku nerkowym, stąd jego pojawienie się w moczu uznawane jest za wskaźnik uszkodzenia komórek nerki u pacjentów z DMt2 [6,32,80,89,198,223].

Transferyna.

Jest białkiem o masie cząsteczkowej zbliżonej do albuminy (76,5 kDa), posiada jednak mniejszy ujemny ładunek elektryczny i jest znacznie lepiej filtrowana do torebki Bowmana od albuminy. Podczas uszkodzenia bariery filtracyjnej transferyna pojawia się w moczu wcześniej i w większych stężeniach niż albumina [125,140,141]. Transferynuria zwykle pojawia się w sytuacji włóknienia i atrofii cewek nerkowych, czy naciekach śródmiąższu nerek przez komórki zapalne [91]. Nie jest to jednak wskaźnik specyficzny dla CChN i może pojawiać się w moczu również w innych pierwotnych glomerulopatiach i chorobach nerek [84].

Adiponektyna.

Adiponektyna jest hormonem peptydowym o masie cząsteczkowej 30 kDa. U chorych z CChN w przebiegu DMt2 zaobserwowano wzrost stężenia tego białka zarówno w surowicy, jak i w moczu. W ocenie progresji CChN, nie potwierdzono większej użyteczności diagnostycznej oznaczenia adiponektynurii w porównaniu z albuminurią [209].

Ceruloplazmina.

Jest białkiem o dużej masie cząsteczkowej (151 kDa) wiążącym miedź we krwi. Zaobserwowano wzrost stężenia ceruloplazminy u chorych z DMt2 i prawidłowym wydalaniem albuminy w porównaniu z grupą kontrolą, a także w porównaniu z chorymi z DMt2 i towarzyszącą „mikro-” i „makroalbuminurią” [140,141].

Laminina.

Laminina jest dużą glikoproteiną (900 kDa), która stanowi główną składową błony podstawnej kłębuszków nerkowych (ang. *glomerular basement membrane*, GBM) oraz mezangium. Ze względu na swoją wielkość, laminina nie jest filtrowana przez kłębuszki nerkowe, lecz jedynie wydzielana do moczu przez nerki [78]. Zaobserwowano, że w DMt2 wydalanie lamininy z moczem było większe w porównaniu z grupą kontrolną nie chorującą na cukrzycę. Zanotowano również znacząco wyższy stosunek laminina/kreatynina w moczu u chorych z CChN w porównaniu z nefropatiami nie związanymi z DMt2 [83].

2.4.2. Wskaźniki uszkodzenia cewek nerkowych.

Biowskaźniki uszkodzenia cewek nerkowych są zasadniczo enzymami wykrywanymi w moczu lub białkami osocza o małej masie cząsteczkowej. Wzrost stężenia tych białek w moczu związany jest z zaburzeniem ich reabsorpcji z moczu pierwotnego przez komórki cewek nerkowych [7,78]. Enzymy wydzielane są do moczu z uszkodzonych lub regenerujących się komórek [38] i mogą być bardzo czułymi wskaźnikami uszkodzenia cewek nerkowych. W większości nie mogą być jednak filtrowane przez kłębuszki nerkowe z powodu dużej masy cząsteczkowej [8,78].

α 1-mikroglobulina.

Jest to białko o masie cząsteczkowej 26-31 kDa, które występuje we krwi w formie niezwiązanej lub tworząc kompleksy z immunoglobuliną A i albuminą. W warunkach prawidłowych jest ono swobodnie filtrowane w kłębuszkach nerkowych, jednak jego stężenie w moczu może znacząco wzrastać w sytuacji uszkodzenia komórek cewek proksymalnych [226]. Zaobserwowano wzrost stężenia α 1-mikroglobuliny w moczu u chorych z DMt2 w porównaniu z grupą kontrolną, nawet u pacjentów bez klinicznych objawów CChN [19,123]. Stężenie tego białka w moczu korelowało również dodatnio ze wzrostem albuminurii oraz wielkością hemoglobiny glikowanej (HbA1c) [79].

β 2-mikroglobulina.

Jest białkiem o małej masie cząsteczkowej (11,8 kDa) ulegające swobodnej filtracji w kłębuszkach nerkowych, a następnie jest zwrotnie wchłaniane w kanalik proksymalnym cewek nerkowych przy udziale megaliny [153]. Zaobserwowano, że u chorych z obniżonym GFR dochodzi do wzrostu stężenia krążącej β 2-mikroglobuliny w surowicy krwi, natomiast w DMt2 wraz ze wzrostem stężenia tego białka w moczu zwiększa się częstość występowania

powikłań naczyniowych [115,225]. Zasadniczą wadą ograniczającą zainteresowanie rutynowym pomiarem tego biopskaźnika w moczu jest jego szybka degradacja w niskim pH (poniżej 6,0), co czyni go stosunkowo mało użytecznym parametrem w praktyce klinicznej [123].

Białko wiążące retinol 4.

Białko wiążące retinol 4 (ang. *retinol-binding protein*, RBP4) to mała cząsteczka (ok. 21 kDa) syntetyzowana głównie w hepatocytach. Jego nazwa jest pochodną funkcji jaką pełni w organizmie, związanej z transportem retinolu z wątroby do tkanek obwodowych [187]. We krwi RBP łączy się w kompleks z transtyretyną i w tej postaci ulega filtracji w kłębuszkach nerkowych. RBP prawie w całości jest reabsorbowane z moczu pierwotnego w cewce proksymalnej nefronu. Wydalanie RBP z moczem ma miejsce głównie w sytuacjach uszkodzenia komórek nabłonka cewek proksymalnych [114]. U chorych z DMt2 obserwowano wzrost poziomu RBP w moczu w szczególności przy współistnieniu nefropatii, retinopatii i neuropatii obwodowej [77].

N-acetylo- β -D-glucosaminidase (NAG).

NAG jest enzymem o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej (powyżej 130 kDa), który nie ulega filtracji w kłębuszkach nerkowych. Jest to białko lizosomów komórek nabłonkowych cewki proksymalnej nefronu, a jego podwyższone poziomy pojawiają się na skutek działania czynników potencjalnie toksycznych dla cewek nerkowych [9,11,107]. Zaobserwowano zwiększoną aktywność NAG w moczu chorych na DMt2 znacznie wcześniej przed pojawieniem się „mikroalbuminurii”. Parametr ten uznany został za bardzo czuły i wczesny wskaźnik uszkodzenia nerek w DMt2 [5,208]. Wykazano ponadto, dodatnią korelację między wzrastającą aktywnością NAG w moczu oraz albuminurią, czasem trwania cukrzycy, gorszą kontrolą glikemii, stężeniem cystatyny C w surowicy oraz stężeniem NGAL w moczu [8]. Wykazano również ujemną korelację NAG z klirensiem kreatyniny [224].

Fosfataza alkaliczna.

Fosfataza alkaliczna (ALP, ang. *alkaline phosphatase*) jest enzymem o masie cząsteczkowej od 70-120 kDa, a wielkość cząsteczki uzależniona jest od narządu, w którym odbywa się jej synteza [53]. Białko to występuje również w komórkach błony śluzowej cewek proksymalnych nefronu, w osteoblastach, hepatocytach i komórkach łożyska [4]. Aktywność ALP w surowicy krwi nie wpływa na jej poziom w moczu ponieważ w warunkach

fizjologicznych jest ona filtrowana przez błonę filtracyjną kłębuszków nerkowych. Pojawienie się zwiększonej ilości ALP w moczu może świadczyć o uszkodzeniu cewki proksymalnej nefronu [53]. Zaobserwowano również, że aktywność ALP u osób z DMt2 i CChN jest wyższa w porównaniu z grupą chorych bez CChN. Uznano więc, że ocena aktywności ALP może stanowić wskaźnik uszkodzenia cewki proksymalnej w CChN [53]. Jednak, podobnie jak w przypadku innych enzymów, których aktywność może zmieniać się w zależności od zmiany pH moczu, pomiar ALP w moczu może być obarczony błędem.

Gamma-glutamyltransferaza (GGT).

GGT jest enzymem o masie cząsteczkowej ok. 90 kDa obecnym w cewce proksymalnej nefronu, wątrobie, trzustce oraz w jelicie [52,53]. GGT jest uznany za specyficzny i czuły wskaźnik uszkodzenia komórki oraz czuły marker uszkodzenia cewki proksymalnej [8,103,215]. U osób z cukrzycą obserwowano wzrost GGT w moczu, także u chorych bez objawów uszkodzenia nerek lub „mikroalbuminurii” [87]. Aktywność GGT wzrasta wraz ze wzrostem HbA1c i pogorszeniem funkcji nerek [74,87].

Wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (ang. liver-type fatty acid binding protein, L-FABP).

L-FABP jest białkiem o masie cząsteczkowej 14 kDa, które ulega ekspresji w hepatocytach oraz komórkach cewek proksymalnych nefronu [165]. L-FABP pojawia się w moczu na skutek uszkodzenia komórek cewek nerkowych, natomiast jego wzrost w moczu jest znacząco wyższy u chorych z DMt2 w porównaniu z populacją zdrową, wykazując korelację ze wzrostem albuminurii oraz obniżeniem klirensu kreatyniny [90]. Na wydalanie L-FABP z moczem wpływ może mieć również niedokrwistość oraz przewlekłe cewkowo-śródmiąższowe uszkodzenie nerek [209]. Ilość badań wykonanych dotychczas w celu potwierdzenia użyteczności diagnostycznej tego wskaźnika u chorych z uszkodzeniem nerek w przebiegu cukrzycy jest stosunkowo ograniczona.

Cząsteczka uszkodzenia nerek-1 (ang. kidney injury molecule-1, KIM-1)

Białko to jest cząsteczką błony komórki cewki proksymalnej nefronu [69]. Nie jest wykrywane w warunkach fizjologicznych u osób zdrowych [204]. Pojawia się ono w moczu dopiero na skutek uszkodzenia cewki proksymalnej [187]. U chorych z DMt2 z „makroalbuminurią” stwierdzono wyraźny wzrost KIM-1 w moczu w porównaniu do grupy chorych z „normo-„ i „mikroalbuminurią” oraz grupy kontrolnej [98].

2.4.3. Wskaźniki stresu oksydacyjnego.

Hiperglikemia wpływa niekorzystnie na układ naczyniowy całego organizmu. Na działanie hiperglikemii narażone są przede wszystkim komórki śródbłónka, gdyż glukoza przenika do tych komórek niezależnie od insuliny oraz komórki cewek nerkowych, w których transport glukozy do komórek cewek jest nasilony na skutek wysokiego stężenia glukozy w moczu pierwotnym. Zaproponowano kilka mechanizmów tłumaczących uszkodzenie komórek na skutek hiperglikemii. Jedna z możliwych dróg patogenetycznych dowodzi, że podwyższone wewnątrzkomórkowe stężenie glukozy nasila proces glikolizy i cykl kwasów trójkarboksylowych. Reakcja ta prowadzi do zwiększenia produkcji zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (ang. *nicotin-amide adenosine dinucleotide*, NADH) lub dinukleotydu flawino-adeninowego (ang. *flavin adenine dinucleotide*, FADH₂). Związki te są donatorami elektronów, odpowiedzialnymi za zwiększone wytwarzanie anionu nadtlenkowego, który podlega kolejnej przemianie do nadtlenku wodoru. Nadtlenek wodoru dysocjuje do wody i tlenu cząsteczkowego oraz do rodnika hydroksylowego, który jest związkiem najbardziej z nich cytotoksycznym [20,205]. Indukowane przez hiperglikemię powstające w nadmiarze reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive oxygen species*, ROS) tj.: anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy wywołują stres oksydacyjny, który w konsekwencji prowadzi do zaburzeń czynności śródbłónka i cewek nerkowych w DMt2 [48]. Uważa się, że działania ROS leżą u podstaw większości mechanizmów zapoczątkowujących proces zapalny oraz włóknienie, również w komórkach nerek [93].

8-hydroksy-2-deoksyguanozyna (8-OHdG).

Na skutek oksydacji DNA jądrowego i mitochondrialnego w uszkodzonych komórkach dochodzi do powstania 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny (8-OHdG), która ulega swobodnej filtracji w kłębuszku nerkowym chorych na DMt2 [34]. Zaobserwowano, wzrost stężenia tego wskaźnika w moczu chorych na DMt2 w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [92]. Stężenie 8-OHdG mierzone w moczu u osób z DMt2 korelowało również ze wzrostem HbA1c oraz albuminurią [92,222].

Pentozydyna.

Hiperglikemia może w sposób pośredni uszkadzać komórki nerek na drodze nieenzymatycznej glikacji białek poprzez tworzenie z nimi wiązań kowalencyjnych. W pierwszym, szybkim i odwracalnym etapie glikacji dochodzi do powstania zasady Schiffa, która w kolejnym etapie przekształcona zostaje do nieodwracalnych, późnych produktów

glikacji: N-karboksymetylolizyny, pentozydyny, pyrwaliny, imidazolu [171,179]. AGEs wewnątrz komórki mogą działać cytotoksycznie. Zaobserwowano, że pentozydyna może być wskaźnikiem powikłań DMt2 we krwi, jak i moczu [25]. W populacji chorującej na DMt2 zauważono, że poziom pentozydyny w surowicy krwi ulegał również wzrostowi w przypadkach złej kontroli glikemii oraz przy pogorszeniu funkcji nerek [165].

2.4.4. Wskaźniki stanu zapalnego.

Cytokiny prozapalne są w głównej mierze produkowane przez monocyty krwi obwodowej, ale również w komórkach nerki [219]. Stan zapalny stanowi czynnik ryzyka rozwoju CChN i wydaje się być silniej zaangażowany w patogenezę choroby niż stanowić jego konsekwencję. Czynniki martwicy nowotworów (TNF- α), IL-6 oraz MCP-1 mogą być wykorzystywane jako potencjalne wskaźniki CChN [47,145].

Czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor alfa, TNF- α).

TNF- α jest wczesną cytokiną prozapalną i ważnym mediatorem uszkodzenia tkanek. W nerkach, TNF- α jest syntetyzowany i uwalniany przez makrofagi naciekające tkankę nerek oraz przez komórki śródbłonna, mezangium, kłębuszki i cewki nerkowe [231]. TNF- α uznawany jest za główny czynnik w patogenezie zapalenia, apoptozy, gromadzenia macierzy pozakomórkowej oraz uszkodzenia bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego [97,147]. Jest także odpowiedzialny za indukowanie syntezy ROS w różnych komórkach i działanie cytotoksyczne na komórki nerki, a w szczególności śródbłonna kapilar kłębuszka nerkowego prowadząc do albuminurii i progresji uszkodzenia nerek [97,170]. U chorych z DMt2 wykazano wzrost stężenia TNF- α we krwi oraz w moczu w porównaniu z grupą bez cukrzycy [145], nawet jeśli nie stwierdzano u nich cech uszkodzenia nerek [124]. Ponadto, u osób z DMt2 wydalanie TNF- α wzrasta proporcjonalnie do wzrostu albuminurii [146].

Interleukina 6 (IL-6)

Jest cytokiną biorącą udział w pobudzaniu reakcji zapalnej, również w nerkach u osób chorych na DMt2. Zaobserwowano wzrost jej stężenia we krwi chorych z CChN w przebiegu DMt2 w porównaniu z grupą bez nefropatii [181]. Stężenie IL-6 ulega znacznemu wzrostowi w grupie osób z CChN i „makroalbuminurią” [38]. IL-6 uznawana jest za cytokinę specyficzną dla DMt2, a jej wydalanie z moczem jest większe w porównaniu z grupą bez cukrzycy [220]. Stężenie IL-6 w moczu wzrasta wraz ze wzrostem albuminurii i wiązane jest z progresją CChN u osób z DMt2 [185].

Białko chemotaktyczne monocytów (ang. monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1).

MCP-1 jest chemokiną prozapalną odpowiedzialną za proces chemotaksji leukocytów do uszkodzonych tkanek [207]. Nerkowe MCP-1 syntetyzowane jest poprzez aktywację czynnika jądrowego kappa B (ang. nuclear factor-kappa B, NF- κ B) w komórkach nabłonka cewek nerkowych i komórkach mezangium [60]. Białko to działa chemotaktycznie na monocyty/makrofagi powodując migrację tych komórek do kłębuszków nerkowych i śródmiaższu nerek wywołując w nich zapalenie, zanik cewek nerkowych i włóknienie [176]. Stężenie MCP-1 znacząco wzrasta w moczu chorych z CChN ze współistniejącym uszkodzeniem cewkowo-śródmiaższowym [195]. Zaobserwowano, że u chorych z cukrzycą stężenie MCP-1 w moczu koreluje z albuminurią, naciekaniem śródmiaższu nerek przez makrofagi i wydalaniem NAG z moczem [134,212]. Brak natomiast jednoznacznych danych na temat wzrostu tego wskaźnika w okresie poprzedzającym pojawienie się uszkodzenia nerek w CChN [104].

Rozpuszczalny ligand CD40 (ang. cluster of differentiation 40, CD40).

CD40 jest białkiem występującym na powierzchni komórek prezentujących antygen klasy I, niezbędnym do ich aktywacji i dostarczającym sygnał ko-stymulujący dla limfocytów T. Wykazuje on ekspresję cząsteczki CD154. Powierzchnową część białka CD40 stanowi ligand CD40 (LCD40), którego część nazwana została rozpuszczalnym ligandem CD40 (sCD40L). CD40 występuje konstytutywnie na powierzchni komórek prezentujących antygen tj.: komórek dendrytycznych, limfocytów B i makrofagów. Ekspresja tego antygenu może zostać wyindukowana również na wielu innych rodzajach komórek, np. na komórkach cewek nerkowych i mezangium. Aktywacja CD40 prowadzi do zwiększenia ekspresji samego CD40 oraz innych receptorów z rodziny TNF, a także do produkcji cytokin prozapalnych [27]. Uważa się, że komórki te mogą brać udział w patogenezie procesów zapalnych w obrębie nerek. Badania prowadzone u chorych z DMt2 stwierdzają znacząco wyższe stężenie sCD40L w moczu i we krwi w porównaniu z grupą kontrolną [29]. Stężenie sCD40L w moczu było wyższe u chorych z CChN w porównaniu z chorymi z prawidłowym wydalaniem albuminy z moczem [10].

Tlenek azotu (ang. nitric oxide, NO)

Tlenek azotu jest czynnikiem silnie rozkurczającym naczynia krwionośne, a poprzez działanie na drobne naczynia nerek, wpływa na ciśnienie filtracyjne w kłębuszkach nerkowych i proces wytwarzania moczu pierwotnego. W patogenezie powstawania

wczesnych zmian w CChN bierze się pod uwagę również zmniejszenie biodostępności NO związanej z uszkodzeniem komórek śródbłonna przez hiperglikemię [61,168]. Sugeruje się, że chociaż na wczesnym etapie rozwoju CChN dochodzi do nasilonej produkcji NO i ekspresji syntazy tlenku azotu (NOS), leżących u podstaw hiperfiltracji, to w miarę postępu uszkodzania nerek zmniejsza się produkcja oraz biodostępność NO [136]. U osób z hiperfiltracją kłębuszkową w przebiegu DMt2 wykazano wyższe stężenie NO w porównaniu do osób z cukrzycą, ale bez hiperfiltracji oraz w porównaniu do populacji zdrowej [3]. W innym badaniu obserwowano z kolei znaczący spadek stężenia NO w moczu u osób z nowo wykrytą CChN w przebiegu DMt2 [167]. Dane dotyczące NO w patogenezie CChN są więc sprzeczne, co może wpływać na znaczne ograniczenie zastosowanie tego markera we wczesnej diagnostyce CChN.

TGF- β 1 (ang.: transforming growth factor)

Rozwój i postęp włóknienia w nerkach, a w konsekwencji postępujące ich uszkodzanie wiąże się również z nadprodukcją czynników wzrostu odpowiedzialnych za proces włóknienia. W moczu chorych z DMt2 stwierdzono obecność tkankowego czynnika wzrostu (TGF- β 1), który jest wydzielany z komórek cewek nerkowych, a jego stężenie w moczu wzrasta wraz z postępem choroby nerek [200]. W randomizowanym badaniu klinicznym zaobserwowano wzrost stężenia krążącego TGF β 1 u chorych z niewydolnością nerek w przebiegu CChN [219].

Haptoglobina

Haptoglobina zaliczana jest do białek ostrej fazy, a jej rola biologiczna związana jest z wychwytem wolnej hemoglobiny we krwi. Podwyższone stężenie haptoglobiny u osób z DMt2 bez cech CChN (eGFR>60ml/min/1,73m², albuminuria poniżej 300 mg/dobę) odkryto wykorzystując metodę spektrometrii masowej białek moczu podczas badania porównującego z populacją zdrową. Autorzy badania postulują, że wartość stosunku haptoglobiny do kreatyniny może być użyteczna w ocenie ryzyka CChN u chorych z DMt2, zanim jeszcze dojdzie do wzrostu wskaźnika albumina/kreatynina w moczu (ang. *albumin/creatinine ratio*, ACR) lub do obniżenia się wartości GFR [12]. Na modelach zwierzęcych udowodniono, że ekspresja genu dla haptoglobiny wzrasta w ostrym uszkodzeniu zarówno kłębuszków, jak i cewek nerkowych, chociaż tych ostatnich w znacznie mniejszym stopniu [227].

2.4.5. Białka w moczu specyficzne dla uszkodzenia podocytów.

Podocyturia oraz proteinuria białek związanych z podocytami mogą stanowić wskaźniki uszkodzenia nerek w przebiegu CChN. Zaobserwowano obecność podocytów w osadzie moczu u chorych z CChN oraz u chorych z „mikro” lub „makroalbuminurią” [201]. Opisywano również obecność białek specyficznych dla podocytów: nefryny i synaptopodiny w moczu chorych z cukrzycą i białkomoczem oraz obniżonym GFR [213]. Markery te nie są jednak specyficzne dla CChN i mogą pojawiać się w moczu chorych na inne przewlekłe nefropatie [100].

2.4.6. Proteomika i metabolomika w poszukiwaniu idealnego biowskaźnika uszkodzenia nerek w DMt2.

Proteomika łączy w sobie różne techniki laboratoryjne celem symultanicznej oceny setek lub nawet tysięcy białek. Dziedzina ta zajmuje się nie tylko tworzeniem list ważnych białek, ale przede wszystkim bada różnice w profilu białek u osób zdrowych oraz chorych. Zaletą identyfikacji profilu białek moczu za pomocą technik proteomiki jest jej nieinwazyjność. Jednocześnie techniki jakimi posługuje się proteomika mogą stanowić alternatywę dla diagnostyki opartej na ocenie jednego wskaźnika, a symultaniczna analiza dużej liczby białek i markerów peptydowych pozwala stworzyć profil choroby tzw. „finger print” [95]. Wykorzystując metodę spektrometrii masowej Rossing i wsp. [174] zidentyfikowali 273 peptydy w moczu w grupie chorych z cukrzycą typu 1 i 2. Profile takie wydają się być znacznie lepszymi predyktorami progresji CChN niż albuminuria [174]. Inna grupa badaczy zidentyfikowała polipeptydy bardzo specyficzne dla CChN, wydalone z moczem, którymi okazały się fragmenty kolagenu, a marker ten pojawia się ok. 3-5 lat wcześniej przed wzrostem albuminurii [233]. Papale i wsp. [155] w badaniu do którego zrekrutowali chorych z DMt2 i „normoalbuminurią” oraz „mikroalbuminurią”, chorych z potwierdzoną w biopsji nerki CChN oraz zdrowych ochotników, zidentyfikowali ubikwitynę i ss2-mikroglobulinę, jako potencjalne predyktory CChN [155]. Wydaje się zatem, że przyszłość badań laboratoryjnych prowadzonych w celu wykrycia wczesnego biomarkera uszkodzenia nerek w przebiegu CChN w dużej mierze związana jest z metodami spektrometrii masowej [126].

Za pomocą spektrometrii masowej zidentyfikowano również 12 spośród 94 aktywnych metabolitów przemiany glukozy w głównym wewnątrzkomórkowym szlaku glikolitycznym (w cyklu kwasów trójkarboksylowych). Zwiększone stężenie tych metabolitów w moczu chorych na DMt2 może świadczyć o PChN związanej z cukrzycą [183].

Metabolomika jest z kolei młodą i prężnie rozwijającą się dziedziną wiedzy, wymaga jednak dalszych badań, aby ocenić jej przydatność w diagnostyce CChN.

2.5. NGAL – nowoczesny biomarker uszkodzenia nerek.

NGAL – lipokalina związana z żelatynazą neutrofilii (ang. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) zwanej również lipokaliną 2, czy siderokaliną, jest białkiem o masie cząsteczkowej 25 kDa odkrytym pierwotnie w aktywowanych neutrofilach, jako białko kowalennie związane z żelatynazą ludzkich neutrofilii. Zbudowany z 178 aminokwasów NGAL należy do białek wydzielniczych rodziny lipokalin i występuje głównie w postaci monomeru. Lipokaliny posiadają zdolność wiązania oraz transportowania małych ligandów tj.: retinolu, sideroforów lub feromonów [54]. Wiążące żelazo siderofory są odpowiedzialne głównie za efekty bakteriostatyczne. NGAL wiąże siderofory i transportuje je poprzez specyficzne receptory błonowe do komórek (m.in. poprzez kompleks megaliny). Po połączeniu z receptorem, kompleks NGAL-siderofor ulega internalizacji, co prowadzi do wzrostu poziomu żelaza w cytoplazmie komórkowej. NGAL wydzielany jest w bardzo małych ilościach przez nerki, tchawicę, płuca, żołądek oraz jelito grube, a jego ekspresja zwiększa się znacząco w stanach zapalnych oraz w uszkodzeniach śródbłonna (neutrofile, makrofagi). NGAL ulega swobodnej filtracji przez kłębuszek nerkowy, a następnie jest niemal całkowicie resorbowany w cewce proksymalnej w mechanizmie endocytozy zależnej od megaliny. Wzrost stężenia NGAL w moczu może być skutkiem zarówno uszkodzenia cewki bliższej nefronu i zaburzeń resorpcji zwrotnej, ale również może wynikać ze zwiększonej syntezy NGAL. Taka sytuacja ma miejsce na skutek zwiększonej ekspresji mRNA w dystalnej części nefronu, a w szczególności w ramieniu grubym wstępującym pętli Henlego i w cewce zbiorczej. Wzrost syntezy NGAL w dystalnej części nefronu i jego sekrecja do moczu stanowi główną frakcję NGAL w moczu [64,129].

W nefropatii pokontrastowej, w której dochodzi do uszkodzenia cewki dystalnej, stężenie NGAL w moczu wzrasta na skutek nadekspresji mRNA. W trakcie eksperymentalnego uszkodzenia segmentu S3 cewki proksymalnej w modelu zwierzęcym po podaniu cisplatyny obserwowany jest również wzrost NGAL w moczu [76,130]. NGAL regulując wewnątrznerkowy metabolizm żelaza, wpływa stymulująco na proliferację i odbudowę nabłonka [130]. Spekuluje się, że wzrost poziomu NGAL po uszkodzeniu cewek nerkowych może ograniczać uszkodzenia powstałe na skutek niedokrwienia nerek.

W sytuacjach klinicznych, prowadzących do uszkodzenia narządów obserwowany jest wzrost stężenia NGAL w moczu. [117]. Z kolei spadek filtracji kłębkowej w ostrym

uszkodzeniu nerek (ang. *acute kidney injury*, AKI) może skutkować spadkiem nerkowego klirensu NGAL z następową kumulacją tej lipokaliny w surowicy krwi [62]. NGAL jako biomarker uszkodzenia nerek został wykryty w 2003 r. podczas badań poświęconych poszukiwaniu nowoczesnego biowskaźnika niedokrwiennego oraz toksycznego uszkodzenia nerek [129]. Z badań wynika, że ciągu kilku godzin po zadziałaniu czynnika niedokrwiennego obserwuje się znaczący wzrost NGAL. Pierwsze takie badanie kliniczne ukazało się w 2005 r. i dotyczyło grupy dzieci poddanych zabiegowi kardiochirurgicznemu, u których stwierdzono ponad 50% wzrost kreatyniny jako wyznacznika ostrego uszkodzenia nerek (ang. *acute kidney injury*, AKI). Stężenie NGAL w badanej populacji wzrastało 15-krotnie w ciągu pierwszych 2 godzin po zabiegu kardiochirurgicznym. Czulość diagnostyczna oznaczenia NGAL w surowicy wynosiła 70%, a swoistość 94%, a dla NGAL w moczu wartości te wynosiły odpowiednio: 94,1% oraz 98% [129]. Opinie na temat NGAL jako biowskaźnika AKI powstały w oparciu o wysoką specyficzność tego białka w ostrym uszkodzeniu kanalka nerkowego, wysoką czulość diagnostyczną i wczesny wzrost w surowicy i moczu od momentu zadziałania czynnika uszkadzającego nerki (4-6 godzin) oraz nieinwazyjność badania. Stosując NGAL jako biowskaźnik AKI należy uwzględnić, że obecność: PChN, przewlekłego nadciśnienia tętniczego, ogólnoustrojowego zakażenia, niedokrwistości, niedotlenienia i przy współistnieniu chorób nowotworowych, może prowadzić do nieznacznego wzrostu NGAL w surowicy krwi, niezależnie od uszkodzenia kanalka nerkowego. W przypadku tego wskaźnika ważne jest więc aby monitorować jego stężenie w porównaniu do wartości wyjściowej, przed zadziałaniem czynników uszkadzających [43,117]. Aktualnie badania kliniczne prowadzone pod kątem oceny użyteczności diagnostycznej NGAL w AKI pochodzą z pojedynczych ośrodków i są wykonywane na zbyt małej liczbie pacjentów. W badaniach tych nie stosuje się ponadto, obowiązujących aktualnie ujednoliconych kryteriów rozpoznania AKI, co utrudnia interpretację przedstawianych danych w aspekcie przydatności w diagnostyce AKI, ale również w innych schorzeniach nerek [42,44,151].

W celu oceny użyteczności diagnostycznej NGAL przeprowadzono wiele badań porównujących ten wskaźnik z innymi markerami. Krawczeski i wsp. [102] ocenili cztery najbardziej obiecujące biomarkery wczesnego uszkodzenia nerek w moczu: NGAL, IL-18, L-FABP, KIM-1 odpowiednio w 2-iej, 6-tej, 12-tej i 24 godzinie po rozpoczęciu zabiegu w krążeniu pozaustrojowym w populacji pediatrycznej. Jako pierwszy w moczu tych chorych obserwowany był wzrost NGAL, który pojawiał się już po 2 godzinach. Parikh i wsp. [157] opublikowali niedawno dane pochodzące z prospektywnego, randomizowanego,

wieloośrodkowego badania z udziałem 1219 dorosłych poddanych zabiegowi kardiochirurgicznemu, u których oznaczano wydalanie interleukiny 18 (IL-18) i NGAL w moczu oraz NGAL w surowicy, jako potencjalne markery AKI. W badaniu tym dowiedziono, że u chorych po operacjach kardiochirurgicznych, stężenie NGAL jest proporcjonalne do stopnia i ciężkości oraz czasu trwania AKI. W prowadzonej analizie regresji wieloczynnikowej, NGAL stanowi istotny wskaźnik wczesnego wykrycia ostrego uszkodzenia nerek [157]. NGAL oznaczany zarówno w moczu, jak i w surowicy wzrasta znacząco również u chorych z PChN o różnej etiologii (wielotorbielowatość, idiopatyczne kłębuszkowe zapalenia, nefropatia zaporowa, zespół nerczycowy, tubulopatie, CChN) w stadiach od 2 do 4 [17,119,131]. Zaobserwowano, że stężenie NGAL w surowicy jest wyższe w grupie chorych hemodializowanych w porównaniu z grupą kontrolną [16,121]. Po przeprowadzeniu pojedynczej hemodializy stężenie NGAL w surowicy obniżyło się blisko trzykrotnie, stąd uważa się, że oznaczenie NGAL może być jednym z wyznaczników adekwatności dializy [16]. NGAL uwalniany z cewek nerkowych może być również wskaźnikiem cewkowo-śródmiąższowego uszkodzenia nerek. Obserwowano ponadto wzrost stężenia tego białka w moczu chorych na nefropatię IgA [45].

NGAL może służyć jako biomarker aktywności choroby w toczniu trzewnym układowym, w szczególności jego pomiar w moczu jest dobrym wskaźnikiem nawrotu choroby zarówno w populacji dzieci, jak i dorosłych [21, 62, 175, 182]. Zaobserwowano, że NGAL w moczu wzrasta u chorych, u których podejrzewano nefrotoksyczność cyklosporyny, stąd jego pomiar może służyć jako wskaźnik nefrotoksyczności u biorców przeszczepów i chorych leczonych cyklosporyną z powodu nefropatii [65, 214]. NGAL oznaczany w moczu jest obiecującym biowskaźnikiem zakażeń w układzie moczowym, a wprowadzony do diagnostyki iloraz NGAL/kreatynina w moczu jest pomocny już na etapie rozpoznania [232]. W prospektywnym, wieloośrodkowym badaniu, u chorych z sepsą leczonych na oddziałach intensywnej terapii zaobserwowano, że osoczowy poziom NGAL oznaczany łącznie z białkiem C i receptorem dla interleukiny 1 stanowią optymalny panel do oceny ryzyka rozwoju niewydolności narządowej, wstrząsu i śmiertelności u tych chorych [182]. W przebiegu schorzeń sercowo-naczyniowych osoczowy NGAL jest biowskaźnikiem aktywacji leukocytów i degranulacji neutrofilów, a jego poziom jest znacząco wyższy w porównaniu ze zdrową grupą kontrolą [56]. Stężenie NGAL w moczu wzrasta u chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z pacjentami z prawidłowym ciśnieniem tętniczym [118]. Podobnie w przebiegu choroby wieńcowej, wzrost NGAL w surowicy koreluje z cięższym przebiegiem choroby i jest predyktorem śmiertelności u starszych osób z niewydolnością mięśnia serca

[15,232]. Przeprowadzono również badania dotyczące przydatności klinicznej oznaczania stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr u chorych na DMt2. Yang i wsp. [224] podczas rocznej obserwacji stwierdzili wyraźny wzrost NGAL w moczu (uNGAL) u chorych z CChN w przebiegu DMt2. Bolignano i wsp. [18] udowodnili z kolei, że stężenie NGAL w surowicy i moczu wzrasta w zależności od zaawansowania CChN u chorych z „normoalbuminurią” i „mikroalbuminurią”. Zaobserwowano również, że zwiększone wydalenie NGAL z moczem jest wskaźnikiem obniżania się filtracji kłębuszkowej (eGFR) u chorych z DMt2 zarówno z „mikro”- jak i „makroalbuminurią” [148]. Fu i wsp. [58] zaobserwowali, że uszkodzenie cewek nerkowych pojawia się u chorych z krótkim czasem trwania cukrzycy, a uNGAL może być bardziej obiecującym i wczesnym wskaźnikiem uszkodzenia nerek w DMt2 niż UACR. Białkomocz nie związany z albuminurią również znacząco korelował z uNGAL u chorych z niezaawansowaną CChN ($eGFR \geq 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$) [99]. W innym badaniu dotyczącym populacji chińskiej zaobserwowano, że wzrost uNGAL koreluje ze spadkiem eGFR i wzrostem albuminurii u chorych z DMt2 [221].

W Tabeli 2 zawarto przegląd najważniejszych badań dotyczących oznaczania stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr u chorych na DMt2.

Tabela 2. Przegląd najważniejszych badań dotyczących oznaczania stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr w moczu u chorych na DM t2.

Autor pracy	Rok publikacji	GB (n)	GK (n)	eGFR (ml/min/1,73 m ²)	T DMt2 (lata)	HbA1c (%)	Albuminuria (mg/g)	uNGAL (ug/dl) lub uNGAL/uCr (ug/g)	metoda badania uNGAL	Wnioski (znamiennie statystycznie)
Bolignano D. i wsp. [18]	2009	56	18	NA 119±17 MI 101±11 MA 72±18	Brak danych	6,9±1,1 7,3±1,2 7,1±0,9	6,6 99,1 1099,4	51,1 105,9 255,6	Badanie techniką ELISA	1. Stężenie uNGAL jest wyższe u chorych z NA w porównaniu z grupą kontrolną. 2. Stężenie uNGAL wzrasta w grupie z DMt2 wraz ze wzrostem wydalania albuminy z moczem. 2. Stężenie uNGAL koreluje z progresją choroby nerek (eGFR) i sCr
Yang Y.H. i wsp. [224]	2009	64	brak	NA 99,3±20,25 MI 101,52±34,4 MA 53,38±40,9	8,96±6,21 111,1±6,8 11,92±5,88	8,02±2,35 9,00±2,5 7,92±2,28	<30mg/24h 30-300mg/24h >300mg/24h	15,6±18,6 26,5±29,4 72,2±59,4	Badanie techniką ELISA	1. Obserwacja trwająca średnio 12 mies. 2. Stężenie uNGAL wzrasta proporcjonalnie do wzrostu albuminurii. 3. Stężenie uNGAL koreluje ujemnie z eGFR MDRD.
Jiao L.Y. i wsp. [85]	2011	70	20	Brak danych	Brak danych	Brak danych	Brak danych	Brak danych	Brak danych	1. Stężenie uNGAL koreluje ze spadkiem eGFR.
Nielsen S.E. i wsp. [148]	2012	177	brak	90	12±7	7,8±1,3	104 (39-238)	101(56-225)	Badanie techniką ELISA	1. Obserwacja trwająca średnio 3,5 roku. 2. Wyższy wskaźnik uNGAL/uCr koreluje z niższą wartością eGFR u chorych z MI i MA 3. Wskaźnik uNGAL/uCr koreluje dodatnio z albuminurią i HbA1c.

Autor pracy	Rok publikacji	GB (n)	GK (n)	eGFR (ml/min/1,73 m²)	T DMt2 (lata)	HbA1c (%)	Albuminuria (mg/g)	uNGAL (ug/dl) lub uNGAL/uCr (ug/g)	metoda badania uNGAL	Wnioski (znamiennie statystycznie)
Assal H.S. i wsp. [5]	2013	70	20	>30	NA 5±2,2 MI 8±3,7 MA10,2±3,0	7,6±0,7 8,0±1,3 9,3±0,6	13,3±8,0 120,3±67,0 739,4±284,9	7,4 10,1 17,4	Badanie techniką ELISA z moczu zamrożonego w -20°C	1. Wskaźnik uNGAL/uCr koreluje dodatnio z albuminurią, sCr, czasem trwania cukrzycy i HbA1c.
Wu J. i wsp. [221]	2013	201	63	>60	NA 5,25±5,31 MI7,07±4,13 MA8,94±3,9	<6	NA11,3 MI73,5 MA729,1	12,54 14,99 32,03	Badanie techniką ELISA z moczu zamrożonego do -80°C	1. Obserwacja trwająca 28 miesięcy 2. Wskaźnik uNGAL/uCr koreluje z albuminurią 3. Wzrost stężenia uNGAL koreluje ze spadkiem eGFR.
Chou K.M. i wsp. [28]	2013	140	brak	p 86,4±31,1 k 74,4±27,3	brak	7,8±1,4	p 264,9±1060,3 k 557, ±2092,5	p 18,3±58,2 k 23,3±21,0	Badanie techniką ELISA	1. Obserwacja trwająca 20,31±2,15 miesięcy. 2. Wzrost wskaźnika uNGAL/uCr koreluje ze spadkiem eGFR 3. Brak wzrostu wskaźnika uNGAL/uCr w okresie obserwacji. 3. Brak korelacji między wskaźnikiem uNGAL/uCr oraz albuminurią.

GB (n) - liczba chorych w grupie badanej; GK (n) - liczba chorych w grupie kontrolnej; T DM t2 – czas trwania DMt2 w latach; p - na początku badania; k - pod koniec badania, NA – „normoalbuminuria”; MI – „mikroalbuminuria”; MA – „makroalbuminuria”; H - grupa z hiperfiltracją; BH – grupa bez hiperfiltracji

2.6. Wpływ wielokierunkowego zapobiegania CChN u chorych z DMt2.

Wczesne rozpoznanie i konsekwentne, wielokierunkowe leczenie DMt2 oraz chorób współistniejących może skutecznie hamować progresję zmian w nerkach i poprawiać rokowanie. W praktyce postępowanie takie jest jednak zbyt rzadko i za późno stosowane, głównie z powodu małej symptomatyki chorób nerek we wczesnych etapach rozwoju choroby. W Tabeli 3 przedstawiono modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka CChN u chorych z DMt2 [229].

Tabela 3.

Modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka CChN u chorych z DM t2 [229].

Czynniki nie podlegające modyfikacji	Czynniki podlegające modyfikacji
czynniki genetyczne	nieprawidłowa kontrola glikemii
pleć męska	nadciśnienie tętnicze
długość trwania cukrzycy	zaburzenia lipidowe
długość życia	palenie tytoniu
wywiad rodzinny w kierunku CChN, DMt2, nadciśnienia tętniczego, oporności na insulinę	otyłość
	insulinooporność
	obecność stanów zapalnych
	endotoksyny
	zaawansowane końcowe produkty glikacji białek
	mała aktywność fizyczna
	podaż soli w diecie

Nieprawidłowa glikemia stanowi główny i podlegający modyfikacji czynnik ryzyka CChN. Korzystny efekt wynikający z lepszej kontroli glikemii w przebiegu DMt2 dobitnie wykazano w przełomowym badaniu United Kingdom Protective Diabetes Study (UKPDS) [137]. Udowodniono w nim, że intensyfikacja leczenia hipoglikemizującego u chorych z nowo wykrytą DMt2 redukuje względne ryzyko CChN (ocena albuminurii) o 24%, pomimo

stosunkowo niewielkiej różnicy wartości HbA_{1c} (0,9%). W innym badaniu - ADVANCE wykazano, że u chorych na DMt2, leczonych intensywnie w celu uzyskania wartości hemoglobiny glikowanej na poziomie 6,5%, istotnie statystycznie rzadziej obserwowano „mikroalbuminurię” niż w grupie z HbA_{1c} równą 7,3% [196]. Efekt hiperglikemii nie zależy w tym przypadku tylko od bezwzględnych wartości HbA_{1c}, ale również od ich zmienności. U chorych z DMt2 i towarzyszącą CChN, którym przeszczepiono trzustkę, po 5 latach normoglikemii obserwowano regresję nefropatii w nerkach własnych (zmiany kłębuszkowe, reabsorbcja atroficzných cewek, zmniejszenie objętości tkanki śródmiąższowej bez wpływu na szkliwienie arterioli) [51].

W Tabeli 4 przedstawiono kryteria wyrównania gospodarki węglowodanowej u chorych z DMt2 [228].

Tabela 4.

Kryteria wyrównania gospodarki węglowodanowej u chorych z DMt2 [229].

Kryterium	Wartość
HbA _{1c}	<u>≤7% - kryterium ogólne</u> jeśli u chorego na cukrzycę >65 roku życia przewiduje się przeżycie dłuższe niż 10 lat (realizując ogólne cele leczenia, należy dążyć do stopniowego wyrównania cukrzycy, przyjmując jako docelową wartość HbA _{1c} ≤7%)
HbA _{1c}	≤6,5% - w przypadku krótkotrwałej DMt2
HbA _{1c}	≤8% - w przypadku chorych powyżej 70 lat z wieloletnią cukrzycą (>20lat), u których współistnieją istotne powikłania o charakterze makroangiopatii (przebyty zawał serca i/lub udar mózgu)
HbA _{1c}	≤6,1% u kobiet planujących ciążę i będących w ciąży

Wzrost skurczowego ciśnienia tętniczego jest klasycznym czynnikiem ryzyka uszkodzenia nerek. Obecnie wiadomo, że istnieje zależność pomiędzy nadciśnieniem tętniczym oraz chorobą nerek. Nadciśnienie tętnicze przyspiesza proces uszkodzenia nerek, z kolei uszkodzenie nerek może być przyczyną wzrostu ciśnienia tętniczego. Niektóre badania sugerują wręcz, że wysokie wartości ciśnienia tętniczego mogą wyprzedzić moment

rozpoznania CChN [49]. Wraz ze wzrostem ciśnienia tętniczego wzrasta też albuminuria. U chorych na DMt2 z prawidłową albuminurią częstość występowania nadciśnienia tętniczego może sięgać nawet 70% [229]. W zaleceniach PTD z 2014 roku sprecyzowano zasady postępowania terapeutycznego z zastosowaniem blokady RAA w szczególnych sytuacjach klinicznych u chorych z CChN [229]. Zastosowanie ACEI należy rozważyć w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych u chorych >55 roku życia, niezależnie od wartości ciśnienia tętniczego. Nie zaleca się również obniżenia wartości ciśnienia tętniczego poniżej 120/70 mmHg, czy stosowania blokady RAA u osób normotensyjnych z albuminurią <30mg/g [13,68,229]. W celu prewencji wystąpienia CChN zaleca się stosowanie blokady RAA u chorych normotensyjnych z towarzyszącą albuminurią $\geq 30\text{mg/g}$. U chorych na DMt2 z towarzyszącym nadciśnieniem tętniczym i albuminurią zarówno ACEI, jak i ARB opóźniają postęp nefropatii [228]. W dwóch dużych badaniach RENAAL i IDNT, przeprowadzonych w populacji chorych na DMt2, udowodniono spowolnienie postępu CChN poprzez efektywną kontrolę ciśnienia tętniczego przy zastosowaniu blokady RAA [176]. Klinicyści wiążą spore nadzieje z potencjalnym nefroprotektynym działaniem doustnych inhibitorów reniny. Jednym z nielicznych leków w tej grupie jest *Aliskiren* – wysokospecyficzny, silny inhibitor reniny prowadzący do obniżenia poziomu angiotensyny I i angiotensyny II w krążeniu oraz wzrostu stężenia reniny w krążeniu. W badaniach AVOID [157] i ALTITUDE [159], oceniano wpływ leku dołączonego do sartanu lub inhibitora enzymu konwertującego na białkomocz oraz hamowanie progresji CChN. Zaobserwowano, że leki te zmniejszają albuminurię. Nie stwierdzono jednak korzyści w zakresie ich wpływu na poprawę funkcji nerek czy zmniejszenia liczby powikłań sercowo-naczyniowych. Aktualne wytyczne PTD nie zalecają stosowania połączenia ACEI, ARB i inhibitora reniny [229]. Obniżenie systemowego ciśnienia tętniczego u pacjentów z CChN ma bardzo duże znaczenie dla nefroprotekcji i wiąże się ze zmniejszeniem ciśnienia wewnątrzkrębuszkowego.

Dyslipidemia jest ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju CChN [55]. Każdy chory na DMt2 według standardów kardiologicznych jest traktowany jako pacjent wysokiego ryzyka z celem terapeutycznym osiągnięcia stężenia cholesterolu LDL < 70mg/dl (1,8 mmol/L), niezależnie od tego, czy rozpoznano u niego chorobę niedokrwinną serca [228]. U chorych na DMt2 stosunkowo często występuje aterogenna dyslipidemia, w której stwierdzamy niskie stężenie cholesterolu we frakcji HDL oraz wysokie stężenie triglicerydów [50]. Chociaż brak jest dużych opracowań dokumentujących bezpośrednio nefroprotektynne działanie polegające

wyłącznie na optymalnej kontroli gospodarki lipidowej u pacjentów z albuminurią <30mg/g i prawidłowym ciśnieniem tętniczym wiadomo, że dyslipidemia towarzysząca DMt2 zwiększa ryzyko rozwoju mikroangiopatii i makroangiopatii [63,71]. Dotychczasowa wiedza w tym zakresie nie pozwala jednak w pełni ustalić w jakim stopniu dyslipidemia upośledza czynność nerek i które z lipoprotein są najbardziej zaangażowane w patogenezę CChN [144]. Leczenie dyslipidemii u chorych na DMt2 obejmuje głównie zalecenia dotyczące zmiany stylu życia, w tym zmiany diety polegającej na ograniczeniu spożycia tłuszczów nasyconych i kalorii u osób z nadwagą i otyłością oraz zwiększenie aktywności fizycznej. Farmakoterapia oparta na leczeniu statynami oraz fibratami stanowi kolejny krok służący normalizacji dyslipidemii. Skojarzona terapia (statyna z fibratem) wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia uszkodzenia wątroby, zapalenia mięśni i rabdomiolizy, zwłaszcza przy współistniejącej niewydolności nerek [229].

W Tabeli 5 przedstawiono zakres wartości parametrów lipidowych zalecanych u chorych z cukrzycą (również DMt2) [229].

Tabela 5.

Wartości parametrów lipidowych zalecane u chorych z cukrzycą (również DMt2) [229].

Kryterium	Wartość zalecana
Stężenie cholesterolu całkowitego	< 175mg/dl (4,5mmol/L)
Stężenie cholesterolu frakcji HDL	> 40 mg/dl u mężczyzn (1,0 mmol/L) > 50 mg/dl u kobiet (1,3 mmol/L)
Stężenie triglicerydów	< 150 mg/dl (1,7 mmol/L)
Stężenie cholesterolu frakcji LDL	< 100 mg/dl (2,6 mmol/L) < 70 mg/dl (1,9 mmol/L) u chorych ze współistniejącymi chorobami układu sercowo-naczyniowego
Stężenie cholesterolu „nie HDL”	< 130 mg/dl (3,4mmol/L)

Otyłość jest jedną ze składowych zespołu metabolicznego, którego definicja przechodziła znaczne ewolucje w ciągu ostatnich lat. Otyłość sprzyja rozwojowi DMt2, a w konsekwencji również CChN. W DMt2 podstawowym działaniem terapeutycznym jest redukcja nadmiaru oraz utrzymanie pożądanej masy ciała chorego. Według zaleceń KDOQI z 2007 r., u chorych z cukrzycą należy dążyć do uzyskania i utrzymania prawidłowego współczynnika masy ciała (ang. *body mass index*, BMI) w granicach od 18.5 to 24.9 kg/m² [66]. Leczenie otyłości powinno być skojarzone i opierać się na leczeniu dietetycznym, promowaniu aktywności fizycznej, wsparciu psychologicznym (psychiatrycznym) oraz w ograniczonym zakresie na farmakoterapii. U chorych z wartością BMI > 35kg/m² i współistniejącą DMt2 należy rozważyć kwalifikację do zabiegów z zakresu chirurgii metabolicznej [229].

Palenie tytoniu pozostaje niezależnym czynnikiem rozwoju i progresji nefropatii u chorych na DMt2 [229]. Opisano zwiększone ryzyko wystąpienia „mikroalbuminurii” u chorych na DMt2 palących papierosy [173]. Nieliczne badania w tym zakresie udowodniły związek palenia tytoniu z rozwojem CChN oraz większą częstość występowania mikro i makroangiopatii u pacjentów, którzy nadal palili (53%) w porównaniu z osobami, które zerwały z nałogiem (33%) i osobami niepalącymi (20%) [35,81]. Zaprzestanie palenia papierosów posiada istotne znaczenie w zapobieganiu CChN u chorych z DMt2.

Wysiłek fizyczny stanowi integralną część kompleksowego postępowania w cukrzycy, który po przejściowym, zwiększeniu wydalania albuminy w moczu wpływa korzystnie na wrażliwość na insulinę, kontrolę glikemii, profil lipidowy, sprzyja redukcji masy ciała oraz poprawia nastrój [229]. Ze względu na wielokierunkowe korzyści, aktywność fizyczna powinna być zalecana w prewencji powikłań cukrzycy. PTD jako najbardziej zalecaną formę wysiłku w grupie chorych z DMt2 w wieku > 65 roku życia rekomenduje energiczny (bez zadyszki) spacer, w szczególności po posiłku z częstością 3-5 razy w tygodniu (około 150 min tygodniowo) [229].

PTD zaleca również **spożywanie soli kuchennej** w ilości od 5000-6000mg/d, a u osób z nadciśnieniem tętniczym i nefropatią ≤ 4000mg/dobę [229]. Redukcja podaży soli w diecie jest szczególnie dyskutowana w środowisku nefrologicznym z uwagi na obecność paradoksu sodowego u części chorych z DMt2.

3. CEL PRACY I HIPOTEZA BADAWCZA.

Potrzeba prostego, dokładnego i mało inwazyjnego wskaźnika uszkodzenia nerek, użytecznego w codziennej praktyce klinicznej jest powodem, dla którego poszukuje się idealnego biowskaźnika potwierdzającego rozpoznanie chorób nerek we wczesnym etapie ich rozwoju, dając możliwość szybkiego włączenia leczenia zapobiegającego dalszemu uszkodzeniu nerek i konieczności leczenia nerkozastępczego.

W szczególności celem pracy jest:

1. Ocena zależności pomiędzy wzrostem stężenia NGAL w moczu oraz czasem trwania DMt2.
2. Analiza związku pomiędzy zmianą stężenia NGAL w moczu oraz stopniem wyrównania DMt2.
3. Poszukiwanie zależności pomiędzy zmianą stężenia NGAL w moczu u chorych z DMt2 oraz obecnością powikłań nerkowych i sercowo-naczyniowych.
4. Ocena związku pomiędzy zmianą stężenia NGAL w moczu oraz stosowaniem leczenia wpływającego na układ RAA i gospodarkę lipidową u chorych ze zwiększonym ryzykiem CChN w przebiegu DMt2.

4. Materiał i metody.

4.1. Materiał.

Projekt badawczy zrealizowany został we współpracy pomiędzy Katedrą i Kliniką Nefrologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie oraz Kliniką Szpitalem Wojewódzkim Nr 2 im. Św. Królowej Jadwigi w Rzeszowie.

Do badania zakwalifikowanych zostało łącznie 55 chorych z rozpoznaną DMt2 rekrutowanych spośród chorych zgłaszających się do leczenia w Poradni Nefrologicznej oraz hospitalizowanych w Klinikum Oddziale Chorób Wewnętrznych Nefrologii i Endokrynologii Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Św. Królowej Jadwigi w Rzeszowie.

Do badania zakwalifikowano chorych w wieku powyżej 18 lat spełniających wymagane kryteria włączenia tj.: pacjentów z DMt2, z szacowaną filtracją kłębuszkową (eGFR) powyżej 60ml/min/1,73m² oraz bez jawnego białkomoczu. Obecność DMt2 stwierdzano na podstawie dostępnej dokumentacji lekarskiej lub na podstawie przeprowadzonego testu doustnego obciążenia 75g glukozy - OGTT (ang. *Oral Glucose Tolerance Test*) [229].

Do badania nie zakwalifikowano chorych, którzy nie wyrazili świadomej zgody na udział w badaniu potwierdzonej własnoręcznym podpisem, a także chorych, u których stosowano w bieżącym leczeniu potencjalnie nefrotoksyczne leki, chorych z innymi chorobami nerek, zakażeniem dróg moczowych, zakażeniem ogólnoustrojowym, chorobą nowotworową, udokumentowaną w wywiadzie alergią, chorobą układową tkanki łącznej, niedokrwistością oraz nieustabilizowanym nadciśnieniem tętniczym ($\geq 140/90$ mmHg w samokontroli lub w kontroli w trakcie pobytu w szpitalu).

Dodatkowo, w celu porównania zmian w zakresie analizowanych parametrów utworzono grupę kontrolną złożoną z 22 pacjentów bez cukrzycy, rekrutowanych spośród pacjentów Poradni Nefrologicznej oraz hospitalizowanych w Klinikum Oddziale Chorób Wewnętrznych Nefrologii i Endokrynologii Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Św. Królowej Jadwigi w Rzeszowie. Kryteria włączenia do grupy kontrolnej dotyczyły grupy dorosłych chorych bez cukrzycy z wartością eGFR MDRD powyżej 60ml/min/1,73m², bez białkomoczu i zakażenia dróg moczowych oraz cech zakażenia ogólnoustrojowego. Do badania nie kwalifikowano kobiet w ciąży. Do grupy kontrolnej rekrutowano wyłącznie chorych z ujemnym wywiadem w kierunku stosowania leków potencjalnie nefrotoksycznych, brakiem chorób alergicznych, chorób układowych tkanki łącznej oraz niedokrwistości.

Brak cukrzycy w grupie badanej stwierdzano na podstawie wywiadu, dostępnej dokumentacji lekarskiej oraz oznaczenia glikemii na czczo.

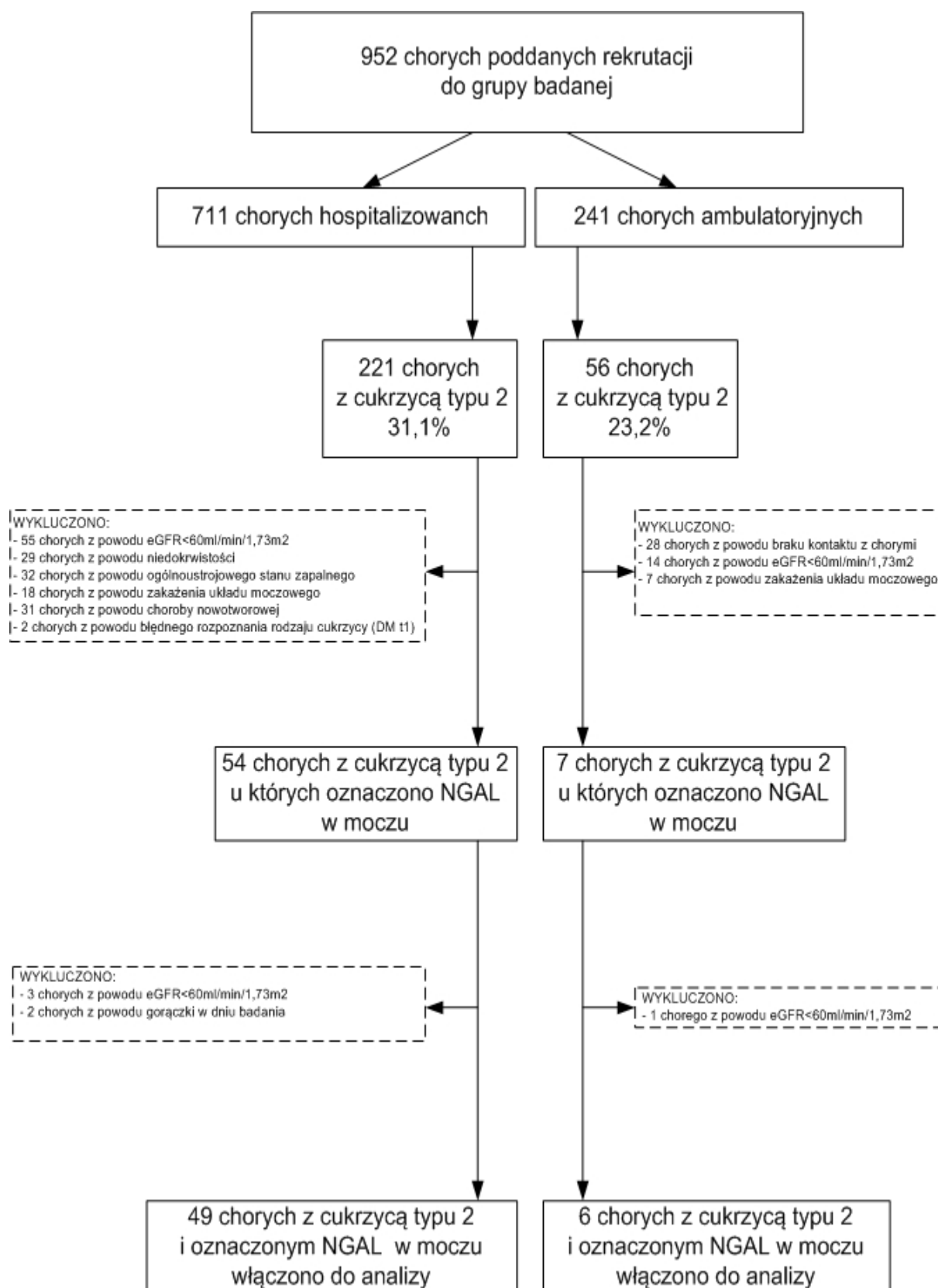
Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie (Nr40/2013/B).

4.2. Protokół badania.

Szczegółowy plan rekrutacji oraz liczebność badanej grupy przedstawiono na Rycinie 2.

Rycina 2.

Przebieg rekrutacji chorych do grupy badanej.



W oparciu o przedstawione powyżej kryteria włączenia i wyłączenia, przeanalizowano zebrane dane kliniczne oraz laboratoryjne.

W toku analizy zebrano informacje dotyczące:

- wieku
- płci
- wskaźnika masy ciała (BMI)
- czasu trwania cukrzycy
- stosowanego leczenia ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania inhibitorów reduktazy koenzymu A (statyn) i leków hamujących układ RAA
- chorób współistniejących z DMt2, ze szczególnym uwzględnieniem nadciśnienia tętniczego i chorób sercowo-naczyniowych
- stężenia hemoglobiny
- całkowitej liczby leukocytów
- wartości stężenia kreatyniny w surowicy krwi
- wskaźnika eGFR MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)
- wskaźnika CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)
- stężenia kreatyniny w porannej porcji moczu
- stężenia albuminy w porannej porcji moczu
- stężenia NGAL w porannej porcji moczu
- wartości HbA_{1c} w grupie chorych z cukrzycą
- profilu lipidowego (stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu we frakcjach LDL, HDL oraz stężenie trójglicerydów)

Zgromadzone dane kliniczne i laboratoryjne zostały zaimplementowane do specjalnie utworzonej bazy danych.

4.3. Metodyka badań.

4.3.1. Ocena ogólna grupy badanej.

Z każdym chorym zakwalifikowanym wstępnie do badania, przeprowadzano wnikliwe badanie podmiotowe ze szczególnym uwzględnieniem czasu trwania cukrzycy, chorób i objawów chorobowych współistniejących, które mogłyby wykluczać chorego z badania obserwacyjnego. Następnie przeprowadzono dokładne badanie przedmiotowe zwracając szczególną uwagę na objawy mogące wykluczyć chorego z badania (zgodnie z protokołem). Kolejno poddawano analizie dostępną dokumentację lekarską (papierową i elektroniczną) w

poszukiwaniu wyników badań kwalifikujących i dyskwalifikujących poszczególnych pacjentów do badania. Każdy pacjent spełniający kryteria włączenia do badania, przed oddaniem próbki moczu i zakwalifikowaniem go do obserwacji podpisał świadomą zgodę na udział w badaniu.

4.3.2. Ocena parametrów klinicznych.

4.3.2.1. Wskaźnik masy ciała (BMI).

Wskaźnik wyliczono w oparciu o wzór Queteleta, który zamieszczono poniżej:

$$\text{BMI} = \text{masa ciała [kg]} / (\text{wzrost [m]})^2$$

4.3.2.2. Wskaźnik filtracji kłębuszkowej eGFR, MDRD i CKD-EPI.

Wskaźnik filtracji kłębuszkowej wyliczono:

a) w oparciu o równanie MDRD [105], które zamieszczono poniżej:

$$\text{GFR (ml/min/1,73m}^2\text{)} = 186,3 \times [\text{stężenie kreatyniny (mg/dl)}]^{-1,154} \times [\text{wiek (lata)}]^{-0,203} \times C$$

gdzie:

C = 1 w przypadku mężczyzn, 0.742 w przypadku kobiet, 1.212 w przypadku rasy czarnej

b) w oparciu o równanie CKD-EPI [106], które zamieszczono poniżej:

$$\text{GFR} = 141 \times \min(\text{Scr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Scr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{wiek}} \times 1.018 \text{ [dla kobiet]} \times 1.159 \text{ [dla rasy czarnej]}$$

gdzie:

Scr – stężenie kreatyniny w surowicy w mg/dl

κ = 0.7 w przypadku kobiet

κ = 0.9 w przypadku mężczyzn

α = - 0.329 w przypadku kobiet

α = - 0.411 w przypadku mężczyzn

min=minimalny wskaźnik Scr/ κ lub 1

max= maksymalny wskaźnik Scr/ κ lub 1

4.3.2.2.1. Szacowanie wskaźnika filtracji kłębuszkowej – aktualne zalecenia u chorych z DMt2.

Pogląd na sposób szacowania filtracji kłębuszkowej u chorych z PChN zmieniał się w ciągu lat. Opracowany w 1976 roku wzór Cockrofta-Gaulta powstał na podstawie danych uzyskanych od 249 hospitalizowanych mężczyzn i wartości klirensu kreatyniny z dobowej zbiórki moczu [31]. Był on przez lata bardzo popularny ze względu na swą prostotę, jednak typ badanej populacji (tylko mężczyźni) i brak uwzględnienia sekrecji cewkowej kreatyniny, musiał ustąpić miejsca równaniu MDRD.

Wzór MDRD powstał w 1999 roku na podstawie danych uzyskanych od 1628 pacjentów z PChN, przy zastosowaniu niestandardyzowanych pomiarów stężenia kreatyniny [109]. W sposób znaczący „niedoszacowuje” on GFR w zakresie 60–120 ml/min, a „przeszacowuje” przy GFR wyższym niż 120 ml/min [67]. W związku z tym nie powinien być stosowany u osób z GFR przekraczającym 60 ml/min.

Wzór CKD-EPI powstał w 2009 roku w oparciu o dane uzyskane od 8254 osób zarówno z upośledzoną, jak i prawidłową funkcją nerek [106]. Chociaż w równaniu użyto tych samych zmiennych co we wzorze MDRD (stężenie kreatyniny, wiek, płeć, rasa), to pozwala on na uzyskanie znacznie mniejszego błędu w wyliczeniu GFR, zwłaszcza w przedziale 60–90 ml/min. Za granicę rozpoznania PChN, KDOQI przyjęło wartość 60 ml/min, a w oparciu o wzór CKD-EPI uzyskuje się znacząco mniej fałszywie dodatnich rozpoznań PChN [82]. W zaleceniach KDIGO z 2013 roku dotyczących diagnostyki i leczenia PChN, w ocenie filtracji kłębuszkowej u dorosłych rekomendowane jest zastosowanie wzoru 2009 CKD-EPI [94]. Wzór 2009 CKD-EPI powinien być traktowany jako ważna ewolucja dotychczasowego wyliczania przesączania kłębuszkowego, PTD zaleca jednak, aby do określania wartości filtracji kłębuszkowej stosować nadal wzór MDRD [228]. Według najnowszych zaleceń KDIGO [94], opublikowanych w 2013 roku, PChN jaką jest również CChN, powinniśmy definiować jako nieprawidłowości w budowie nerek lub ich funkcji, trwające dłużej niż 3 miesiące i klasyfikować określając przyczynę choroby nerek, GFR i albuminurię według stadiów zamieszczonych na Rycinie 3.

Rycina 3.

Klasyfikacja przewlekłej choroby nerek wg KDIGO [94].

Ocena progresji PChN za pomocą GFR i albuminurii wg KDIGO 2012				Kategorie utrzymującej się albuminurii		
				Opis i zakres		
				A1	A2	A3
				Prawidłowa do nieznacznie podwyższona <30 mg/g <3 mg/mmol	Umiarkowanie podwyższona 30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	Znacznie podwyższona >300 mg/g >30 mg/mmol
Kategorie GFR (ml/min/1,73m ²) Opis i zakres	G1	Prawidłowy lub podwyższony	≥90			
	G2	Łagodnie obniżony	60-89			
	G3a	Łagodnie do średnio obniżony	45-59			
	G3b	Średnio do znacznie obniżony	30-44			
	G4	Znacznie obniżony	15-29			
	G5	Niewydolność nerek	<15			

Poszczególne kolory oznaczają rokowanie w PChN. Zielone pole oznacza niskie ryzyko (jeżeli nie ma innych wskaźników choroby nerek, nie rozpoznajemy PChN), żółte pole - umiarkowanie większe ryzyko PChN, pomarańczowe pole - wysokie ryzyko PChN, natomiast czerwone pole oznacza bardzo wysokie ryzyko PChN.

4.3.2.3. Wskaźnik albumina/kreatynina w pojedynczej porcji moczu.

Zmierzono stężenie albuminy oraz kreatyniny w pojedynczej porannej porcji moczu, a następnie zastosowano wzór zamieszczony poniżej:

$$\text{Albumina(mg/l):Kreatynina(g/l)=UACR(mg/g)}$$

4.3.2.4. Wskaźnik NGAL/kreatynina w pojedynczej porcji moczu (uNGAL/uCr).

Zmierzono stężenie NGAL oraz kreatyniny w pojedynczej porannej porcji moczu, a następnie zastosowano wzór zamieszczony poniżej:

$$\text{NGAL(ug/l):kreatynina(g/l)=uNGAL/uCr(ug/g)}$$

4.3.2.5. Ocena pozostałych parametrów klinicznych.

Brak cech aktywnego zakażenia oceniano na podstawie badania fizykalnego z pomiarem temperatury ciała mierzonym termometrem elektronicznym Accusystem Genius w przewodzie słuchowym zewnętrznym oraz dostępnych badań laboratoryjnych tj.: ocena całkowitej liczby leukocytów, pomiar stężenia ultraczułego białka C-reaktywnego (ang. *high-sensitivity C-reactive protein*, hsCRP) oraz prokalcytoniny (PCT). Brak zakażenia dróg moczowych oceniano na podstawie wywiadu (brak objawów dyzurycznych) oraz oceny osadu moczu. W przypadku występowania leukocyturii każdorazowo wykonywano posiew moczu. Do badania kwalifikowano chorych bez objawów dyzurycznych, bez leukocyturii lub z jałową leukocyturią potwierdzoną posiewem moczu. Brak choroby nowotworowej oceniano na podstawie badania fizykalnego, wywiadu, badań obrazowych, a także w wybranych przypadkach na podstawie oznaczeń markerów nowotworowych, badań endoskopowych i histopatologicznych. Wpływ leków potencjalnie nefrotoksycznych na funkcję nerek oceniano na podstawie wywiadu oraz dostępnej dokumentacji lekarskiej. Brak innej choroby nerek oceniano na podstawie wywiadu oraz dostępnych badań dodatkowych. W ocenie tej brano pod uwagę między innymi wartość filtracji kłębuszkowej, obraz nerek w badaniu USG oraz badanie ogólne moczu z oceną białkomoczu i osadu moczu. Choroby układowe tkanki łącznej i alergię wykluczano na podstawie wywiadu, dostępnej dokumentacji medycznej oraz objawów klinicznych. Nie kwalifikowano chorych z podejrzeniem w/w schorzeń lub w trakcie ich diagnostyki.

Do badania kwalifikowano chorych z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego. W przypadku chorych ambulatoryjnych opierano się na dokumentacji pomiarów ciśnienia

tętniczego krwi w samokontroli oraz pomiarach ciśnienia tętniczego wykonywanych w trakcie wizyty w poradni nefrologicznej. Pomiary ciśnienia u chorych hospitalizowanych wykonywane były rutynowo (3-4 pomiary dziennie) zgodnie z zasadami pomiaru ciśnienia tętniczego np. Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego z 2011r. [215]. Do oceny ciśnienia stosowano manometr zegarowy TM-Z/S firmy TECH-MED. Niedokrwistość oceniano na podstawie badania fizykalnego każdorazowo uzupełnionego o badanie morfologii krwi z oceną stężenia hemoglobiny (HGB), liczby erytrocytów (RBC), średniej objętości krwinki czerwonej (MCV) i odsetka krwinek hipochromicznych (% hypo).

4.3.3. Badania laboratoryjne.

Badania laboratoryjne wykonane zostały w Klinicznym Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Św. Królowej Jadwigi w Rzeszowie u wszystkich chorych oraz w grupie kontrolnej. Stężenie NGAL, albuminy, kreatyniny oraz badanie ogólne moczu wykonywano w pierwszej porannej porcji moczu. Na podstawie pomiarów stężenia albuminy i kreatyniny w moczu wyliczono UACR. Analogicznie na podstawie pomiarów stężenia NGAL i kreatyniny w moczu wyliczano wskaźnik uNGAL/uCr.

W próbce krwi pobranej na czczo (na fluorek) w grupie chorych oraz grupie kontrolnej wykonano ocenę poziomu glikemii. Badanie hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) oraz badanie morfologii krwi wraz z rozmazem wykonano we krwi pełnej wersenianowej (K₂EDTA). Ponadto, w surowicy krwi oznaczone zostały następujące parametry: hsCRP, pełny profil lipidowy obejmujący stężenie triglicerydów (TG), cholesterolu całkowitego (Cholesterol-total) i cholesterolu we frakcjach (LDL-cholesterol i HDL-cholesterol) oraz stężenie kreatyniny z wyliczeniem eGFR CKD-EPI.

4.3.3.1. Metody uzyskiwania i przechowywania materiału do badań.

Pacjenci oddawali próbki moczu bezpośrednio po odpoczynku nocnym do jałowych pojemników. Badanie wykonywano w dniu uzyskania materiału, po dostarczeniu go z oddziału lub poradni.

Badania z krwi wykonywano po pobraniu próbki krwi na czczo w ciągu tej samej hospitalizacji lub w przypadku chorych z poradni nefrologicznej w dniu pobrania. Krew do badań laboratoryjnych pozyskiwana była poprzez nakłucie żył przedramienia. Krew do badania pobierano do systemów próżniowych firmy Sarstead.

Do badań biochemicznych pobierano krew do probówek nie zawierających dodatkowych antykoagulantów, a następnie po ok. 30 minutach, po wytworzeniu się skrzepu

odwirowywano przez 10 minut z prędkością 4000 obrotów/min. Tak uzyskaną surowicę oddzielano od elementów morfotycznych i wykorzystywano do oceny lipidogramu, stężenia kreatyniny oraz białka hsCRP.

Do badania morfologii krwi obwodowej wraz z rozmazem pobierano krew pełną do probówek zawierających roztwór wersenianu dwupotasowego (K₂EDTA) i dokładnie mieszano. Morfologię krwi wykonywano w dniu badania podmiotowego i przedmiotowego pacjenta.

Pobieranie materiału do badań było zgodne z zasadami medycyny laboratoryjnej opartej o dowody naukowe (Evidence-based Laboratory Medicine).

4.3.3.2. Metody oznaczeń analizowanych parametrów.

4.3.3.2.1. Analiza moczu i oznaczenia parametrów moczu.

Badanie ogólne moczu wykonano z porannej porcji moczu przy użyciu analizatora Labumat-Uriised 2. Stężenie NGAL w porannej porcji moczu oznaczono przy użyciu metody wykorzystującej chemiluminescencję z mikrocząsteczkami CMIA (chemiluminescent microparticle immunoassay) i dostępnej komercyjnie przy użyciu platformy ARCHITECT (ARCHITECT® Analyzer, Abbott Diagnostics, Abbott Park USA).

Stężenie albuminy w porannej porcji moczu oznaczano przy użyciu metody immunoturbidymetrycznej, natomiast stężenie kreatyniny w porannej porcji moczu oznaczono przy użyciu metody enzymatycznej. Oba parametry mierzone były w analizatorze biochemicznym Olympus AU680.

Zakres wartości referencyjnych przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6.

Badane wskaźniki oceniane w pojedynczej porcji moczu wraz z wartościami referencyjnymi.

Parametr badany	Jednostka	Zakres wartości referencyjnych
NGAL	µg/l	<131,7
albumina	mg/l	<30,0
kreatynina	g/l	brak
UACR	mg/g	<30
uNGAL/uCr	µg/g	brak danych

4.3.3.2.2. Oznaczenia parametrów biochemicznych.

Badania parametrów biochemicznych oraz enzymatycznych wykonywane były w surowicy krwi chorych z wykorzystaniem zautomatyzowanej platformy immunochemicznej na analizatorze biochemicznym Olympus AU680. Zakres wartości referencyjnych wraz z metodyką oznaczania przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7.

Badane w surowicy parametry biochemiczne, metodologia oznaczeń oraz zakres wartości referencyjnych.

Parametr badany	Jednostka	Zakres wartości referencyjnych	Metoda oznaczania
kreatynina	mg/dl	0,6-1,1	enzymatyczna z kreatyninazą i kreatynazą
	μmol/l	53-97	
glukoza na czczo	mg/dl	59-99	metoda z heksokinazą
	mmol/l	3,3-5,5	
cholesterol całkowity	mg/dl	niskie ryzyko* <200 średnie ryzyko* 200-250 wysokie ryzyko* >250	metoda z esterazą i oksydazą cholesterolową
	mmol/l	niskie ryzyko* <5,2 średnie ryzyko* 5,2-6,5 wysokie ryzyko* >6,5	
cholesterol-HDL	mg/dl	>40	bezpośrednia immunologiczna
	mmol/l	>1,0	
cholesterol-LDL	mg/dl	niskie ryzyko* <130 średnie ryzyko* 130-160 wysokie ryzyko* >160	bezpośrednia – rozpuszczanie wszystkich lipoprotein oprócz LDL, przeprowadzenie cholesterolu w barwny związek
	mmol/l	niskie ryzyko* <3,4 średnie ryzyko* 3,4-4,1 wysokie ryzyko* >4,1	
trójglicerydy	mg/dl	60-150	metoda z oksydazą fosfoglicerolu i oznaczanie nadtlenu wodoru
	mmol/l	0,7-1,69	
HbA1c	%	4-6 dla zdrowych ≥6.5% dla chorych z cukrzycą	immunochematograficzna

*ryzyko chorób sercowo-naczyniowych

4.3.3.2.3. Oznaczanie parametrów hematologicznych.

Do badania morfologii krwi obwodowej wykorzystywano analizator hematologiczny ADVIA 2120i firmy Siemens (Siemens Healthcare Diagnostic, Germany).

Zakres wartości referencyjnych ocenianych w badaniu parametrów hematologicznych zamieszczono w Tabeli 8.

Tabela 8.

Zakres wartości referencyjnych wybranych parametrów hematologicznych.

Parametr badany	Metoda	Jednostka	Zakres wartości referencyjnych
WBC	impedancyjna	$\times 10^3/\mu\text{l}$	4,0-11,0
RBC	impedancyjna	$\times 10^6/\mu\text{l}$	K: 4,2-5,4 M: 4,7-6,1
HGB	automatyczna metoda Drapkina	g/dl	K: 12-16 M: 14-18

K – norma dla kobiet, M – norma dla mężczyzn

4.4. Metody statystyczne

Analizowane dane przedstawiono jako liczbę chorych (odsetek grupy) dla zmiennych nominalnych oraz medianę (dolny-górny kwartył) lub średnią $\pm$ odchylenie standardowe dla zmiennych ciągłych (odpowiednio, o rozkładzie różnym i zbliżonym do normalnego). Normalność rozkładów oceniono testem Shapiro-Wilka. Różnice między dwiema grupami badano przy użyciu testu Manna-Whitney'a lub testu t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych. Do oceny różnic między trzema grupami wykorzystano test Kruskala-Wallisa lub jednoczynnikową analizę wariancji z odpowiednimi testami *post-hoc* (test Tuckey'a dla nierównych licznosci w przypadku analizy wariancji). Do oceny tabel licznosci zastosowano test niezależności chi-kwadrat. Do badania korelacji stosowano współczynnik Pearsona, po zlogarytmowaniu zmiennych o rozkładzie prawoskośnym. Przeprowadzono analizę regresji liniowej wielokrotnej, również wykorzystując zlogarytmowane zmienne o rozkładzie różnym od normalnego (prawoskośnym). Jako zmienne niezależne włączono do tej analizy zmienne, które wykazywały znamienny związek ze zmienną zależną w prostej analizie przy poziomie istotności $p=0,1$ oraz zdefiniowane w tekście wyników zmienne towarzyszące. W opisie wyników regresji liniowej podano współczynniki korelacji cząstkowej dla poszczególnych zmiennych niezależnych oraz standaryzowany współczynnik determinacji (R^2) dla modelu regresji. W wielokrotnej regresji logistycznej w ocenie predyktorów powikłań sercowo-naczyniowych w badanej grupie jako zmienne towarzyszące włączono zmienne określające uznane czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego. W opisie wyników regresji logistycznej podano iloraz szans dla zmiany jednostkowej wraz z 95% przedziałem ufności. Stosowano testy dwustronne. Za istotne statystycznie uznano wyniki przy poziomie istotności (p) $<0,05$. W obliczeniach wykorzystano pakiet Statistica 10.0 (StatSoft). Wyniki istotne statystycznie wyróżniono w tabelach kolorem czerwonym.

5. WYNIKI

5.1. Charakterystyka grup oraz analiza różnic między grupą badaną i kontrolną.

Charakterystykę grupy badanej i kontrolnej przedstawiono w Tabeli 9. Grupy były zbliżone pod względem płci oraz wieku i nie różniły się istotnie pod względem procentowego udziału pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, chorobą niedokrwienną serca, miażdżycą uogólnioną czy niewydolnością serca. W grupie badanej obserwowano nieco niższe stężenia kreatyniny w surowicy niż w grupie kontrolnej, jednak wartości eGFR wyliczone ze wzoru CKD-EPI były zbliżone w obu grupach. U pacjentów z DMt2 wartości BMI oraz całkowita liczba leukocytów we krwi obwodowej były wyższe. Podobnie w przypadku stężenia lipidów (cholesterolu całkowitego i we frakcji LDL oraz triglicerydów). Stężenie cholesterolu we frakcji HDL było wyższe w grupie kontrolnej. W grupie badanej obserwowano wyższe stężenia NGAL w moczu w porównaniu z grupą kontrolną, jednak istotną statystycznie różnicę zaobserwowano tylko dla wskaźnika uNGAL/uCr (Tabela 9).

Tabela 9.

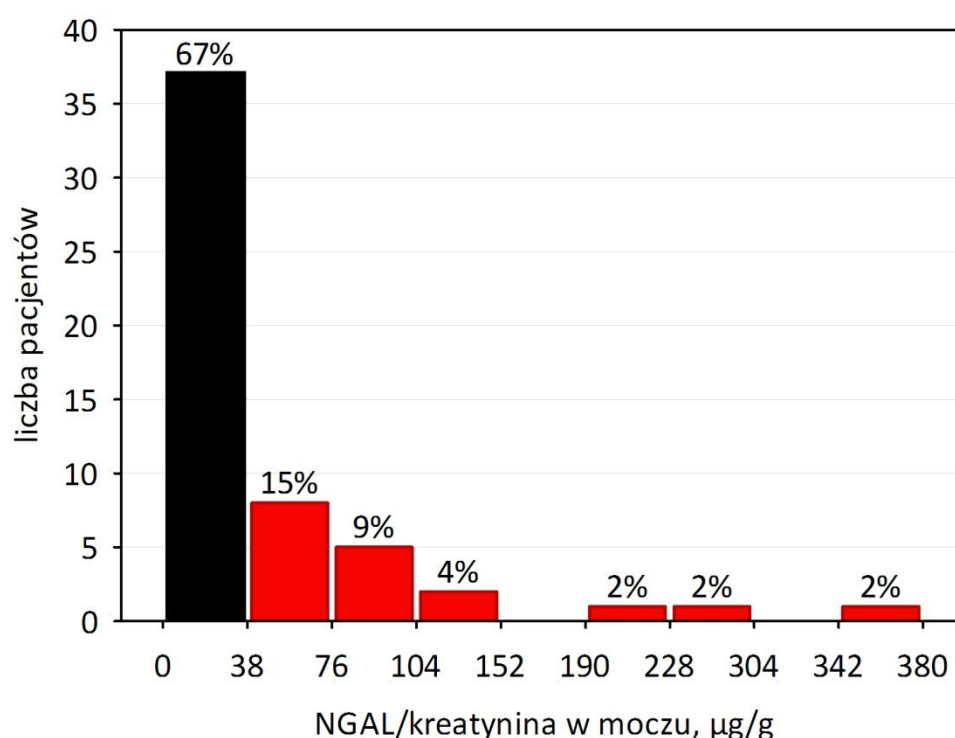
Dane kliniczne i laboratoryjne dla grupy badanej i kontrolnej.

	Grupa badana (N=55)	Grupa kontrolna (N=22)	p
kobiety/mężczyźni; N (%)	29 (53) / 26 (47)	13 (59) / 9 (41)	0,6
wiek; lata	63+/-14	57 +/- 15	0,06
leczeni w poradni; N (%)	6 (11)	6 (27)	0,07
kreatynina w surowicy; [mg/dl] [μmol/l]	0,73 (0,67-0,88) 64,24 (58,96-77,44)	0,80 (0,79-0,90) 70,4(69,52-79,2)	0,046
eGFR(CKD-EPI); [ml/min/1,73m ²]	91 (77-99)	86 (77-99)	0,6
liczba leukocytów; [x10 ³ /μl]	7,51 +/- 2,23	6,31 +/- 1,42	0,022
stężenie hemoglobiny; [g/dl]	14,1 +/- 1,3	14,0 +/- 1,1	0,7
czas trwania cukrzycy; [lata]	6 (1-10)	-	-
cukrzyca świeżo wykryta; [N (%)]	17 (31)	-	-
nadciśnienie tętnicze; [N (%)]	40 (73)	15 (68)	0,5
HbA _{1c} ; [%]	8,1 +/- 2,0	-	-
BMI; [kg/m ²]	31,4 +/- 6,1	28,4 +/- 5,8	0,040

	Grupa badana (N=55)	Grupa kontrolna (N=22)	p
cholesterol całkowity; [mmol/l] [mg/dl]	5,3+/-1,4 204 +/- 55	5,7+/-1,5 220 +/- 57	0,3
cholesterol LDL; [mmol/l] [mg/dl]	3,2+/-1,2 124 +/- 48	3,9+/-1,2 152 +/- 45	0,06
cholesterol HDL; [mmol/l] [mg/dl]	1,2+/-0,31 45,4 +/- 11,6	1,3+/-0,3 51,7 +/- 11,7	0,041
triglicerydy; [mmol/l] [mg/dl]	1,8 (1,2-2,7) 155 (106-234)	1,5 (1,0-1,9) 130 (88-174)	0,09
chorzy leczeni statynami; [N (%)]	30 (55)	10 (45)	0,5
kreatynina w moczu; [g/l]	1,06 (0,62-1,65)	1,40 (0,71-2,24)	0,3
uNGAL; [μg/l]	20,3 (9,9-42,6)	10,9 (6,0-38,2)	0,1
uNGAL/uCr; [μg/g]	21,3 (10,0-51,9)	12,2 (5,9-27,9)	0,014
Albuminuria; [mg/l]	10,0 (6,6-18,2)	5,9 (3,0-22,9)	0,1
UACR; [mg/g]	8,9 (4,2-19,8)	6,0 (3,6-9,0)	0,08
blokada układu RAA [N (%)]	39 (71)	12 (55)	0,2
leukocyturia [N (%)]	8 (15)	1(5)	0,2
choroba niedokrwienna serca [N (%)]	17 (31)	3 (14)	0,1
niewydolność serca [N (%)]	6 (11)	3 (14)	0,7
miażdżyca uogólniona [N (%)]	5 (9)	1 (5)	0,5
TIA [N (%)]	1 (2)	-	-
NSTEMI [N (%)]	1 (2)	-	-
badanie po CT [N (%)]	1 (2)	1 (5)	0,5

TIA- przemijający atak niedokrwienny (ang. *transient ischemic attack*), NSTEMI - zawał serca bez uniesienia odcinka ST (ang. *Non-ST Segment Elevation Myocardial Infarction*), CT - tomografia komputerowa (ang. *computed tomography*)

W grupie kontrolnej maksymalna wartość uNGAL/uCr wynosiła 39,6 $\mu\text{g/g}$, zaś wartość 95. percentyla wyniosła 38,0 $\mu\text{g/g}$. W grupie badanej u 37 pacjentów (67%) wskaźnik uNGAL/uCr nie przekraczał wartości 38,0 $\mu\text{g/g}$, pozostali pacjenci (N=18; 33%) mieli wyższe wartości nawet 9-10 krotnie przekraczające wartość 95. percentyla w grupie kontrolnej (Rycina 4).



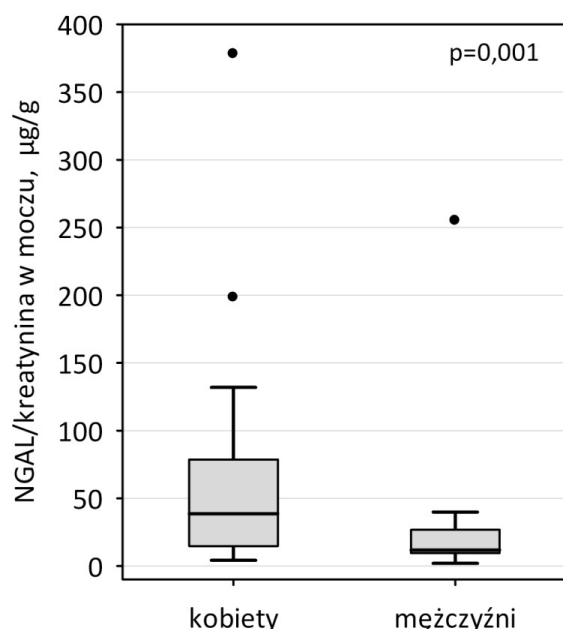
Rycina 4.

Histogram rozkładu wartości uNGAL/uCr w grupie chorych z DMt2 w odniesieniu do wartości 95. percentyla w grupie kontrolnej. Wartość ta wynosiła 38 $\mu\text{g/g}$; kolejne granice przedziałów są wielokrotnościami tej liczby.

5.2. Ocena czynników modyfikujących stężenie uNGAL oraz wielkość wskaźnika uNGAL/uCr.

Korelacje między stężeniem uNGAL oraz uNGAL/uCr i wiekiem pacjentów, BMI, całkowitą liczbą leukocytów we krwi obwodowej, stężeniem kreatyniny w surowicy oraz w moczu oraz wielkością eGFR przedstawiono w Tabeli 10. Nie stwierdzono istotnych zależności między stężeniem NGAL w moczu oraz uNGAL/uCr i wiekiem pacjentów. W grupie badanej obserwowano wyższe wartości uNGAL/uCr u kobiet w porównaniu z mężczyznami (mediana 38,6 *versus* 11,7 $\mu\text{g/g}$; $p=0,001$; Rycina 5), natomiast w grupie

kontrolnej różnica nie była istotna statystycznie (mediana 12,5 $\mu\text{g/g}$ u kobiet *versus* 7,7 $\mu\text{g/g}$ u mężczyzn; $p=0,3$). Nie zaobserwowano również znamiennych różnic związanych z płcią dla wartości nieskorygowanego stężenia uNGAL (mediana odpowiednio u kobiet i mężczyzn: 21,1 i 17,8 $\mu\text{g/g}$; $p=0,1$ w grupie badanej oraz 10,5 i 20,1 $\mu\text{g/g}$; $p=0,2$ w grupie kontrolnej).



Rycina 5.

Wartości wskaźnika uNGAL/uCr u kobiet i mężczyzn w grupie pacjentów chorych na DMt2. Dane przedstawiono jako medianę, dolny-górny kwartyl (ramka), minimum-maksimum nieodstających (wąsy) oraz wartości odstające (punkty).

W grupie kontrolnej wykazano dodatnią korelację między logarytmem stężenia uNGAL (także po korekcji na stężenie kreatyniny) oraz wielkością BMI. Podobnej zależności nie obserwowano jednak w grupie badanej. Zarówno w grupie badanej, jak i w kontrolnej stężenie uNGAL korelowało istotnie ze stężeniem kreatyniny w moczu. Wyższy współczynnik korelacji obserwowano w grupie kontrolnej. W grupie badanej zauważono istotną ujemną korelację między uNGAL/uCr a stężeniem kreatyniny w surowicy. Nie wykazano zależności między stężeniem uNGAL a kreatyniną w surowicy, ani między stężeniem uNGAL oraz uNGAL/uCr a eGFR. W grupie kontrolnej nie wykazano zależności między zmianą stężenia uNGAL, uNGAL/uCr oraz stężeniem kreatyniny w surowicy i wielkością eGFR. W obu grupach nie stwierdzono również istotnych zależności między zmianą stężeń uNGAL oraz całkowitą liczbą leukocytów i stężeniem hemoglobiny we krwi obwodowej. Zaobserwowane korelacje podsumowano w Tabeli 10.

Tabela 10.

Zależności pomiędzy zmianą stężenia uNGAL i uNGAL/uCr oraz wiekiem pacjentów, wielkością BMI, stężeniem kreatyniny w surowicy i moczu oraz eGFR w grupie badanej i kontrolnej.

	Grupa badana (N=55)		Grupa kontrolna (N=22)	
	ln (uNGAL)	ln (uNGAL/uCr)	ln (uNGAL)	ln (uNGAL/uCr)
wiek	R=-0,01 p=0,9	R=0,16 p=0,2	R=0,12 p=0,6	R=0,33 p=0,1
BMI	R=0,11 p=0,4	R=0,08 p=0,6	R=0,51 p=0,018	R=0,49 p=0,024
całkowita liczba leukocytów we krwi obwodowej	R=0,01 p=0,9	R=0,04 p=0,8	R=0,20 p=0,4	R=0,30 p=0,2
stężenie hemoglobiny we krwi obwodowej	R=-0,08 p=0,5	R=-0,16 p=0,2	R=-0,01 p=0,9	R=-0,29 p=0,2
ln (kreatynina w moczu)	R=0,30 p=0,028	R=-0,34 p=0,012	R=0,62 p=0,002	R=-0,08 p=0,7
ln (kreatynina w surowicy)	R=-0,21 p=0,1	R=-0,33 p=0,013	R=-0,24 p=0,3	R=-0,25 p=0,3
ln (eGFR)	R=0,03 p=0,8	R=0,06 p=0,7	R=0,22 p=0,3	R=-0,12 p=0,6

ln – logarytm naturalny

U 8 osób z grupy badanej w ogólnym badaniu moczu wykazano leukocyturię, z ujemnymi wynikami posiewów moczu. Stężenia uNGAL w tej grupie były znamienne wyższe w porównaniu z pozostałymi pacjentami (Tabela 11). Wyższe stężenia uNGAL i wartości uNGAL/uCr odnotowano także u 2 pacjentów, u których oznaczenia wykonano po przeprowadzeniu badania tomograficznego (odpowiednio: 155,6 ng/ml i 131,9 µg/g u pacjenta z cukrzycą oraz 60,4 ng/ml i 13,7 µg/g u pacjenta z grupy kontrolnej).

Tabela 11.

Stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr w grupie pacjentów z leukocyturią w porównaniu z pozostałymi pacjentami.

	Grupa badana (N=55)		Grupa kontrolna (N=22)	
	uNGAL [ng/ml]	wskaźnik uNGAL/uCr; [µg/g]	uNGAL [ng/ml]	wskaźnik uNGAL/uCr; [µg/g]
pacjenci bez leukocyturii	18,0 (8,7-26,3)	14,7 (9,5-33,4)	10,5 (6,0-24,6)	11,9 (5,9-15,9)
pacjenci z leukocyturią	123,8 (88,9-214,4)	90,2 (72,7-227,2)	51,5	33,0
p	<0,001	<0,001	-	-

5.3. Analiza zależności między zmianą stężenia uNGAL i uNGAL/uCr, stężeniem albuminy w moczu oraz UACR.

Zmiany stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr korelowały dodatnio ze stężeniem albuminy i wskaźnikiem UACR w moczu w grupie badanej (po transformacji logarytmicznej zmiennych; Tabela 12). Zależności te potwierdzono po wykluczeniu z grupy badanej pacjentów z leukocyturią. W grupie kontrolnej wykazano również istotną korelację między stężeniami albuminy i uNGAL (Tabela 12), jednak nie potwierdzono istnienia podobnej korelacji po korekcie uwzględniającej stężenie kreatyniny w moczu. Korelacja ta była również istotna po wykluczeniu pacjenta z leukocyturią.

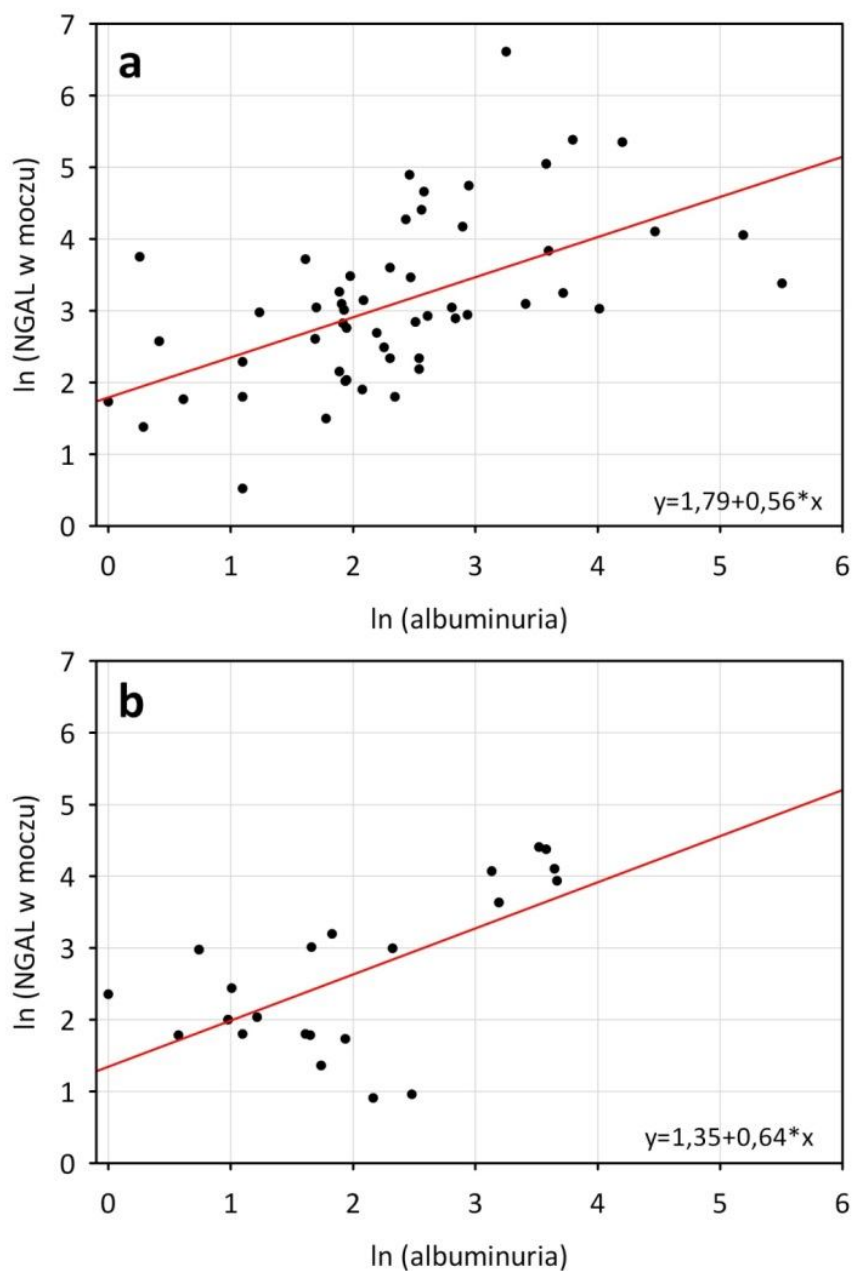
Tabela 12.

Zależności między stężeniem uNGAL i wskaźnikiem uNGAL/uCr a stężeniem albuminy w moczu i wskaźnikiem UACR.

	Grupa badana (N=55)		Grupa kontrolna (N=22)	
	ln (uNGAL)	ln (uNGAL/uCr)	ln (uNGAL)	ln (uNGAL/uCr)
ln (albuminuria)	R=0,55 p<0,001	R=0,32 p=0,016	R=0,63 p=0,002	R=0,17 p=0,4
ln (UACR)	R=0,36 p=0,007	R=0,54 p<0,001	R=0,38 p=0,08	R=0,32 p=0,1

ln – logarytm naturalny

Zależność między zmianą stężenia uNGAL a albuminurią w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono także na Rycinie 6 a i b.

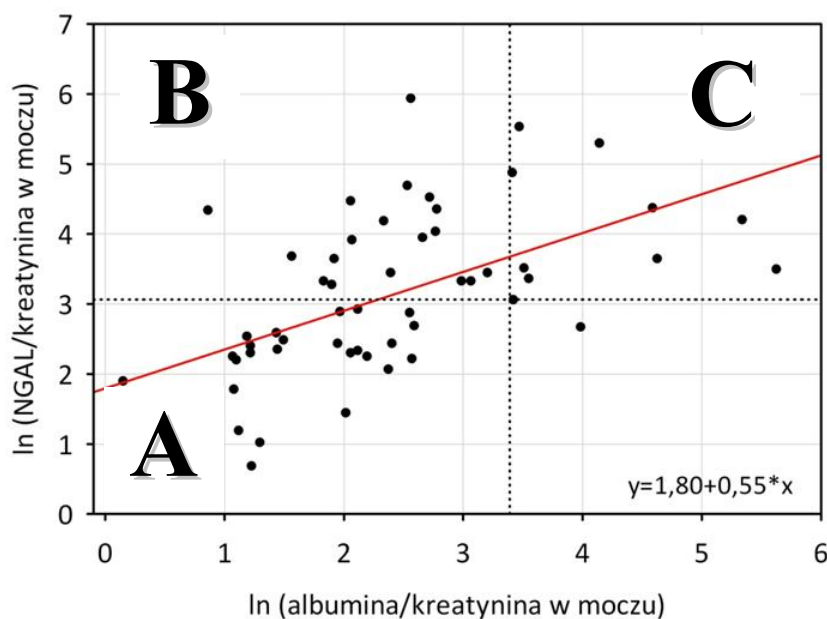


ln – logarytm naturalny

Rycina 6.

Zależność między zmianą stężenia uNGAL i albuminurią w grupie badanej **(a)** i kontrolnej **(b)**. W prawym dolnym rogu wykresów podano równania regresji.

Zależność między wskaźnikiem uNGAL/uCr a wskaźnikiem UACR w grupie badanej przedstawiono na Rycinie 7.



Rycina 7.

Zależność między uNGAL/uCr oraz UACR w moczu w grupie badanej. Kropkowane linie odpowiadają wartościom: uNGAL/uCr = 21,3 μg/g (wartość mediany) i UACR = 30 mg/g. Równanie regresji podano w prawym dolnym rogu wykresu.

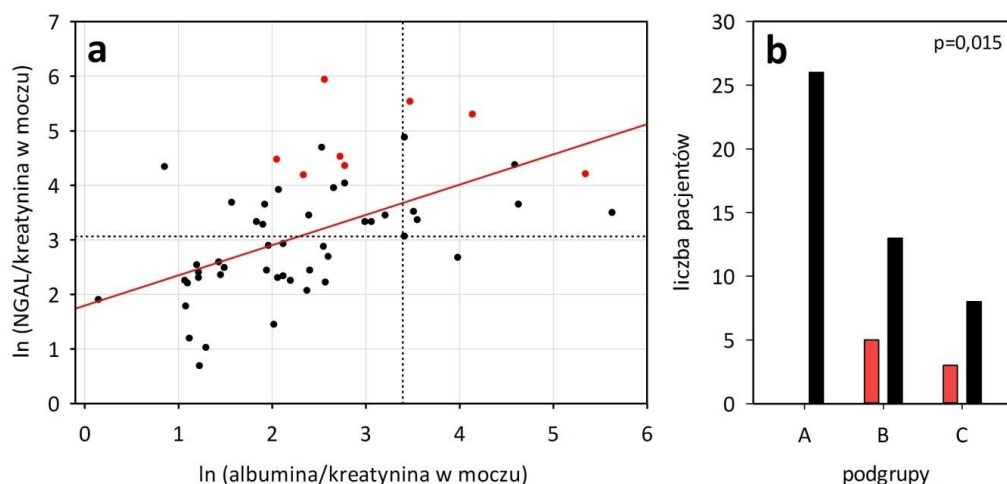
ln – logarytm naturalny

W grupie pacjentów z DMt2 wyróżniono trzy podgrupy różniące się wartościami wskaźników NGAL/kreatynina i albumina/kreatynina w moczu (Rycina 7):

- A. z niskimi wartościami obu wskaźników (uNGAL/uCr < mediany, t.j. 21,3 μg/g oraz UACR < 30 mg/g) – 26 osób
- B. z niską wartością wskaźnika UACR (< 30 mg/g) i wysoką wartością wskaźnika uNGAL/uCr (> 21,3 μg/g) – 18 osób
- C. z wysoką wartością obu wskaźników (uNGAL/uCr > mediany, t.j. 21,3 μg/g oraz UACR ≥ 30 mg/g) z wyjątkiem dwóch pacjentów (osoby te miały niskie wartości wskaźnika uNGAL/uCr) – 11 osób.

Podgrupy te różniły się pod względem częstości występowania leukocyturii u pacjentów ($p=0,015$; Rycina 8). U większości pacjentów bez leukocyturii (26 osób, 55%) wartości uNGAL/uCr oraz UACR były niskie (podgrupa A). Takich wyników nie obserwowano u

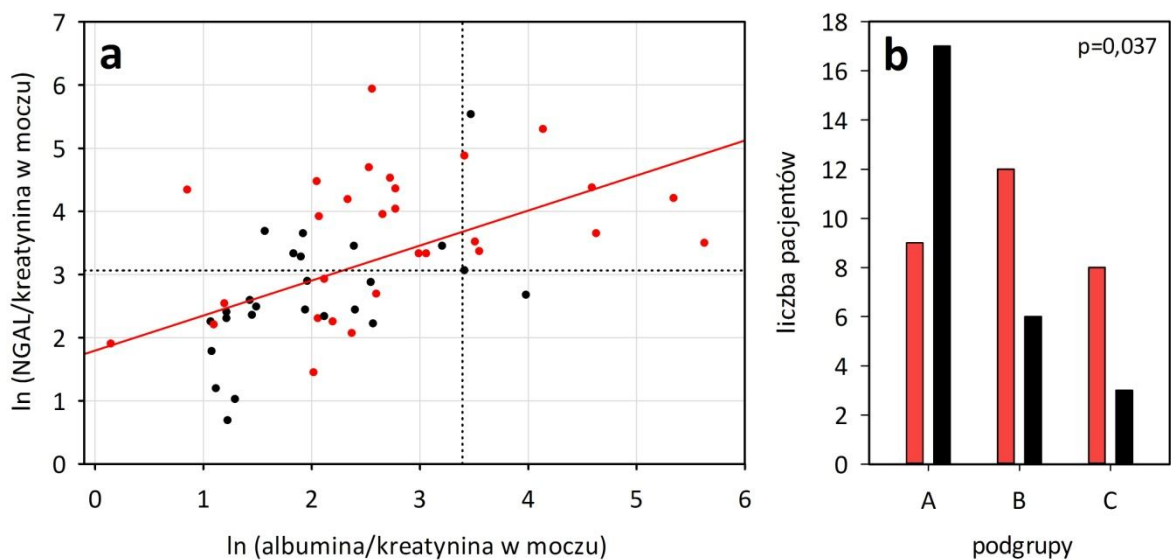
żadnego z pacjentów, u których stwierdzono leukocyurię. W podgrupach B i C występowało odpowiednio 5 (62%) i 3 (38%) pacjentów z leukocyurią oraz 13 (28%) i 8 (17%) pacjentów bez leukocyurii. Podgrupy A, B i C nie różniły się istotnie pod względem wieku ($p=0,2$), BMI ($p=0,9$), liczby leukocytów ($p=0,2$), stężenia hemoglobiny we krwi obwodowej ($p=0,3$), stężenia kreatyniny w surowicy ($p=0,1$), eGFR ($p=0,8$) oraz stężenia sodu w surowicy ($p=0,3$). Również po wykluczeniu pacjentów z leukocyurią nie wykazano w powyższych porównaniach istotnych różnic. Podgrupa A liczyła 17 (65%) mężczyzn i 9 (31%) kobiet ($p=0,037$, Rycina 9). Niskie wartości wskaźnika UACR i wysokie wartości uNGAL/uCr (podgrupa B) posiadało 12 kobiet (41%) i 6 mężczyzn (23%). Podgrupa C liczyła 8 kobiet (28%) i 3 mężczyzn (12%). Warto zaznaczyć, że wśród 8 pacjentów z leukocyurią aż 7 osób (88%) stanowiły kobiety ($p=0,033$). Jednak nawet po wykluczeniu z grupy badanej osób z leukocyurią, wskaźniki uNGAL/uCr i UACR utrzymywały się na wyższym poziomie u kobiet niż u mężczyzn (odpowiednio: mediana 28,6 *versus* 11,4 $\mu\text{g/g}$; $p=0,016$ i mediana 13,0 *versus* 6,2 mg/g ; $p=0,018$). W badanej grupie przeciętny czas trwania cukrzycy był ponad dwukrotnie dłuższy u kobiet niż u mężczyzn (mediana 7 lat w porównaniu do 3 lat u mężczyzn; $p=0,031$).



ln – logarytm naturalny

Rycina 8.

(a) Wartości uNGAL/uCr oraz UACR u pacjentów z leukocyurią (czerwone punkty) w porównaniu do pozostałych pacjentów. Kropkowane linie odpowiadają wartościom: uNGAL/uCr równym 21,3 $\mu\text{g/g}$ (wartość mediany) i UACR równym 30 mg/g . **(b)** Liczba pacjentów z leukocyurią (czerwone słupki) i bez leukocyurii (czarne słupki) w podgrupach wyróżnionych na podstawie wartości wskaźników uNGAL/uCr i oraz UACR (opis w tekście).



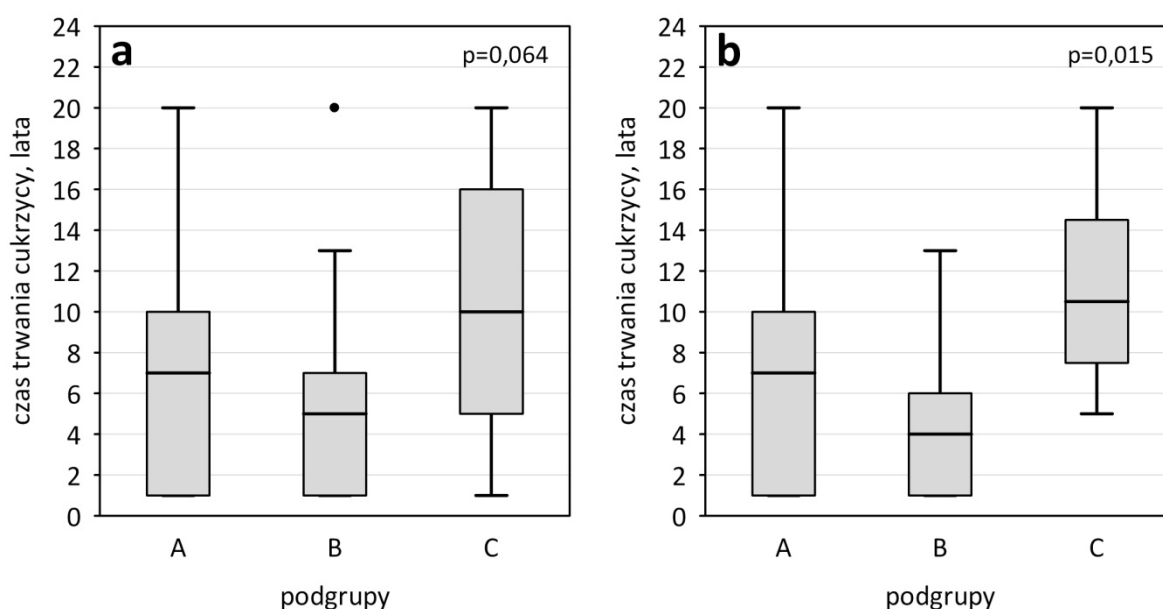
ln – logarytm naturalny

Rycina 9.

(a) Wartości współczynników uNGAL/uCr oraz UACR u kobiet (czerwone punkty) w porównaniu z mężczyznami (czarne punkty). Kropkowane linie odpowiadają wartościom: uNGAL/uCr równym 21,3 $\mu\text{g/g}$ (wartość mediany) i UACR równym 30 mg/g. **(b)** Liczba kobiet (czerwone słupki) i mężczyzn (czarne słupki) w podgrupach wyróżnionych na podstawie wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR (opis w tekście).

5.4. Analiza zależności między zmianą stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr, a czasem trwania i stopniem wyrównania cukrzycy typu 2.

Nie wykazano istotnej zależności między czasem trwania DMt2 a logarytmem stężenia uNGAL ($R=0,05$; $p=0,7$) i logarytmem uNGAL/uCr w moczu badanych chorych ($R=0,14$; $p=0,3$). Grupa badana liczyła 17 pacjentów ze świeżo wykrytą DMt2. Nie wykazano istotnych różnic w zakresie stężeń uNGAL oraz uNGAL/uCr między grupą chorych a pozostałymi pacjentami ($p=0,6$ i $p=0,2$). Zauważono natomiast istotne różnice dotyczące czasu trwania cukrzycy między podgrupami pacjentów wyróżnionymi na podstawie wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR, po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią ($p=0,015$; Rycina 10).

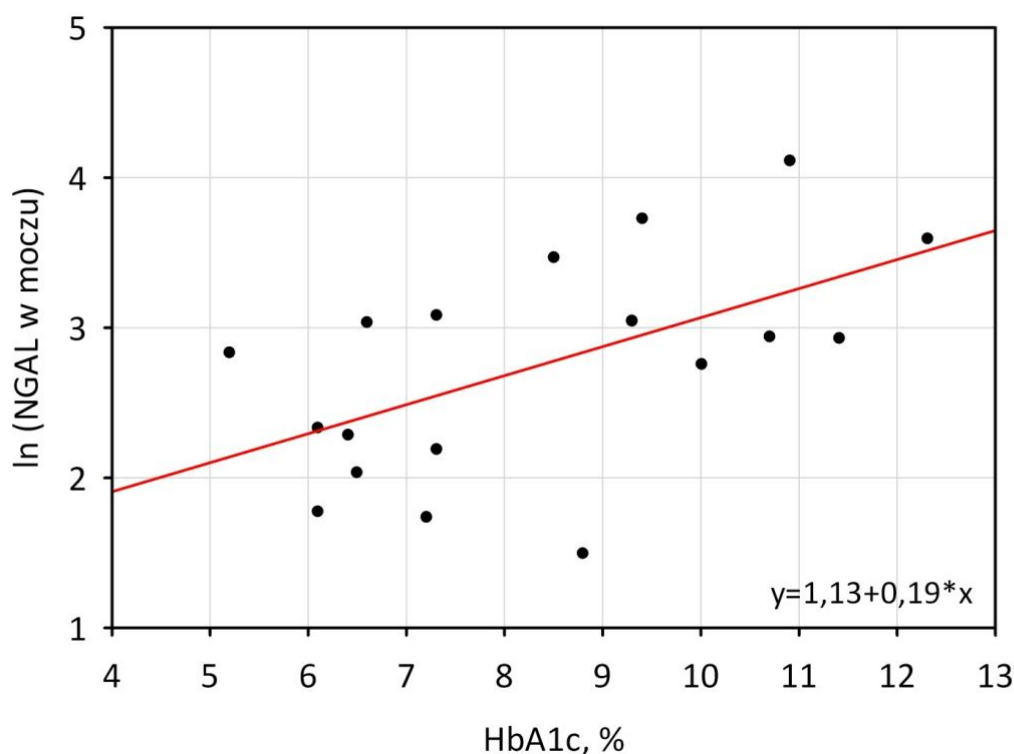


Rycina 10.

Czas trwania DMt2 w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr i UACR (A – niskie wartości obu wskaźników, B – niskie wartości wskaźnika UACR i wysokie wartości wskaźnika uNGAL/uCr, C – wysokie wartości wskaźnika UACR i uNGAL/uCr) w całej grupie badanej (**a**) i po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią (**b**). Dane przedstawiono jako medianę, dolny-górny kwartyl (ramka), minimum-maksimum nieodstających (wąsy) oraz wartości odstające (punkty).

Czas trwania cukrzycy był istotnie dłuższy u pacjentów z wysokimi wartościami wskaźnika UACR (podgrupa C; mediana 10,5 lat) w porównaniu z pacjentami z niskimi wartościami wskaźnika UACR i wysokimi wartościami uNGAL/uCr (podgrupa B; mediana 4,0 lata; $p=0,017$ w teście post hoc). W podgrupie A (z niskimi wartościami obu wskaźników) mediana czasu trwania cukrzycy wynosiła 7,0 lat.

Nie wykazano istotnych korelacji między HbA_{1c} a logarytmem stężenia uNGAL i logarytmem wskaźnika uNGAL/uCr w grupie badanej. Jednak, po wykluczeniu osób z leukocyturią, zależność między $\ln(uNGAL)$ a HbA_{1c} stała się istotna statystycznie ($R=0,56$; $p=0,016$) (Rycina 11). Nie wykazano istotnych różnic w stężeniu HbA_{1c} między podgrupami pacjentów wyróżnionymi na podstawie wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR (średnie w podgrupach A, B i C odpowiednio 7,7; 8,7 i 8,6%; $p=0,5$).



ln – logarytm naturalny

Rycina 11. Zależność między stężeniem HbA_{1c} a stężeniem uNGAL w grupie badanej, po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią. Równanie regresji podano w prawym dolnym rogu wykresu.

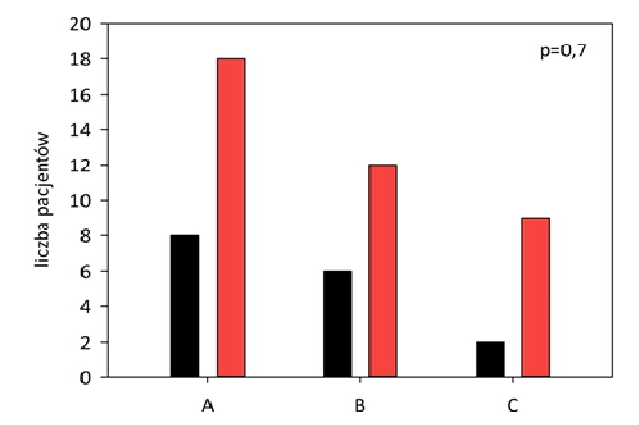
5.5. Analiza zależności między zmianą stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr a blokadą układu RAA.

Stężenia uNGAL i wartości wskaźnika uNGAL/uCr nie różniły się istotnie między pacjentami leczonymi preparatami hamującymi układ RAA, a pozostałymi pacjentami (Tabela 13), również po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią. Liczba pacjentów leczonych preparatami blokującymi układ RAA nie różniła się istotnie między podgrupami pacjentów wyróżnionymi na podstawie wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR ($p=0,7$; Rycina 12).

Tabela 13.

Stężenia uNGAL u pacjentów leczonych preparatami hamującymi układ RAA w porównaniu z pozostałymi pacjentami.

	Grupa badana (N=55)		Grupa kontrolna (N=22)	
	NGAL; [$\mu\text{g/l}$]	uNGAL/uCr; [$\mu\text{g/g}$]	NGAL; [$\mu\text{g/l}$]	uNGAL/uCr, [$\mu\text{g/g}$]
blokada układu RAA	20,8 (10,3-57,4)	27,9 (10,0-65,7)	15,8 (6,0-44,8)	12,2 (6,8-21,6)
bez blokady układu RAA	18,0 (9,3-42,1)	16,6 (10,2-35,6)	10,5 (3,9-24,6)	13,7 (5,9-27,9)
p	0,7	0,4	0,4	0,9



Rycina 12.

Liczba pacjentów leczonych preparatami blokującymi układ RAA (czerwone słupki) oraz nie stosujących tych leków (czarne słupki) w poszczególnych podgrupach wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR (A – niskie wartości obu wskaźników, B – niskie wartości wskaźnika UACR i wysokie wartości uNGAL/uCr, C – wysokie wartości obu wskaźników)

5.6. Analiza zależności między zmianą stężenia NGAL w moczu oraz profilem lipidowym i leczeniem statynami.

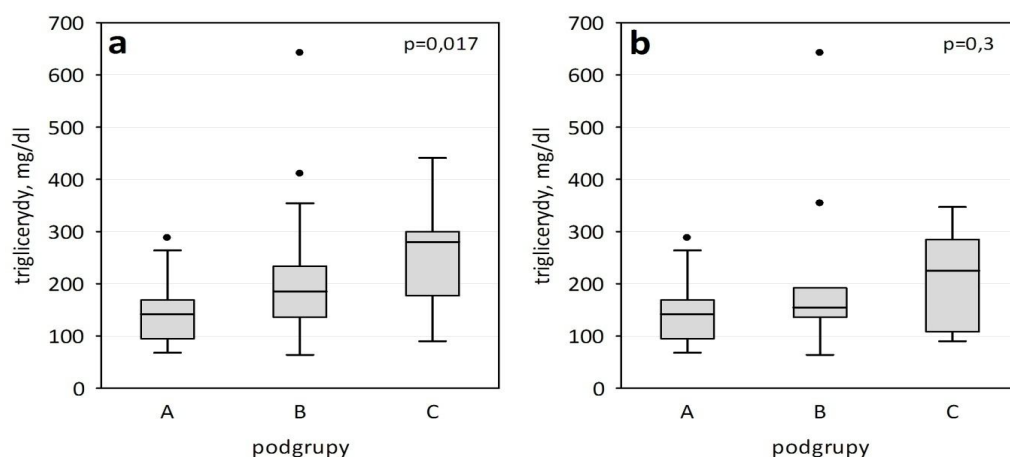
Stężenia cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji LDL i stężenia triglicerydów korelowały ze wskaźnikiem uNGAL/uCr w grupie badanej (Tabela 14). Po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią korelacje te stały się jednak nieistotne statystycznie ($p>0,1$). Najwyższy współczynnik korelacji między zlogarytmowanym stężeniem triglicerydów a $\ln(u\text{NGAL}/u\text{Cr})$ wynosił $p=0,25$. Podobnych korelacji nie wykazano w grupie kontrolnej (Tabela 14).

Tabela 14.

Zależność między stężeniem uNGAL oraz uNGAL/uCr a stężeniami lipidów w surowicy.

	Grupa badana (N=55)		Grupa kontrolna (N=22)	
	$\ln(u\text{NGAL})$	$\ln(u\text{NGAL}/u\text{Cr})$	$\ln(u\text{NGAL})$	$\ln(u\text{NGAL}/u\text{Cr})$
cholesterol całkowity	R=0,26 p=0,061	R=0,33 p=0,014	R=0,26 p=0,3	R=0,14 p=0,6
cholesterol LDL	R=0,32 p=0,025	R=0,45 p=0,001	R=0,14 p=0,6	R=0,21 p=0,4
cholesterol HDL	R=0,04 p=0,8	R=0,10 p=0,5	R=-0,03 p=0,9	R=0,18 p=0,5
$\ln(\text{triglicerydy})$	R=0,37 p=0,008	R=0,42 p=0,002	R=0,13 p=0,6	R=-0,12 p=0,6

Stężenia triglicerydów różniły się istotnie między podgrupami pacjentów wyróżnionymi na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR ($p=0,017$). W teście *post hoc* wykazano istotnie niższe stężenia triglicerydów w podgrupie pacjentów z niskimi wartościami wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR – podgrupa A wobec pacjentów z podgrupy C – z wysokimi wartościami obu wskaźników; $p=0,023$; Rycina 13).



Rycina 13.

Stężenia triglicerydów w surowicy w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR (A – niskie wartości obu wskaźników, B – niskie wartości wskaźnika UACR i wysokie wartości uNGAL/uCr, C - wysokie wartości obu wskaźników) w całej grupie badanej (**a**) i po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią (**b**). Dane przedstawiono jako medianę, dolny-górny kwartyl (ramka), minimum-maksimum nieodstających (wąsy) oraz wartości odstające (punkty).

Różnic tych nie potwierdzono po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią ($p=0,3$). Nie wykazano różnic między opisywanymi podgrupami pacjentów, dotyczących stężeń cholesterolu całkowitego, LDL i HDL (odpowiednio, $p=0,2$; $p=0,4$ i $p=0,9$). Warto zaznaczyć, że w grupie badanej pacjenci z leukocyturią mieli znacznie wyższe stężenia triglicerydów w porównaniu z chorymi bez leukocyturii (mediana 257 versus 148 mg/dl; $p=0,008$). Stężenia uNGAL (także po korekcie uwzględniającej stężenie kreatyniny) nie różniły się między pacjentami leczonymi statynami oraz pacjentami nie stosującymi takiego leczenia, zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej ($p=0,5$ i $p=0,4$). Nie wykazano również istotnych różnic dotyczących liczby pacjentów zażywających statyny w poszczególnych podgrupach grupy badanej, wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR ($p=0,7$).

5.7. Niezależne czynniki predykcyjne dla zmiany stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr.

W celu oceny, które zmienne są niezależnie związane ze zmianą stężenia uNGAL oraz ze wskaźnikiem uNGAL/uCr w grupie badanej, przeprowadzono analizę regresji liniowej wielokrotnej. Zmienne o rozkładzie różnym od normalnego (prawoskośnym) zlogarytmowano przed przeprowadzeniem analizy. Jako zmienne niezależne (predyktory) włączono do analizy te, które w prostych analizach, przedstawionych powyżej, były istotnie związane ze stężeniem uNGAL lub ze współczynnikiem uNGAL/uCr, z wyjątkiem albuminurii i wskaźnika UACR. Dodatkowo jako zmienne niezależne, do analizy włączono wiek pacjentów oraz czas trwania DMt2. Uzyskane modele regresji przedstawiono w Tabeli 15. Wiek pacjentów, obecność leukocyturii oraz stężenie HbA_{1c} okazały się niezależnymi czynnikami predykcyjnymi dla (zlogarytmowanego) stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr pacjentów z DMt2. Dodatkowo wykazano, że uNGAL/uCr u tych pacjentów jest zależny od stopnia zagęszczenia moczu. Związek wieku, HbA_{1c} i leukocyturii ze stężeniem uNGAL oraz uNGAL/uCr potwierdzono także w zredukowanych modelach regresji, nieuwzględniających stężenia triglicerydów i LDL-cholesterolu w surowicy oraz stężeń kreatyniny w surowicy i moczu.

Tabela 15.

Modele regresji liniowej wielokrotnej w prognozowaniu zmiany stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr.

Zmienne niezależne	ln (uNGAL)		ln (uNGAL/uCr)	
	r	p	r	p
wiek	0,54	0,047	0,63	0,017
płeć żeńska	0,13	0,7	0,14	0,6
czas trwania cukrzycy	-0,25	0,4	-0,32	0,3
HbA _{1c}	0,59	0,025	0,70	0,005
leukocyturia	0,74	0,003	0,80	<0,001
ln (TG)	0,18	0,5	0,15	0,6
LDL-cholesterol	-0,11	0,7	-0,18	0,5
ln (uCr)	0,29	0,3	-0,65	0,011
ln (sCr)	0,14	0,6	0,25	0,4
dopasowanie modelu	Skorygowany R ² =0,59; p=0,006		skorygowany R ² =0,67; p=0,003	

ln – logarytm naturalny; r – współczynnik korelacji cząstkowej

5.8. Analiza zależności między zmianą stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr a powikłaniami sercowo-naczyniowymi.

Nie wykazano zależności między zmianą stężenia uNGAL i wskaźnika uNGAL/uCr oraz obecnością nadciśnienia tętniczego u pacjentów z DMt2 i w grupie kontrolnej (Tabela 16).

Tabela 16.

Stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i bez nadciśnienia tętniczego.

	Grupa badana (N=55)		Grupa kontrolna (N=22)	
	uNGAL; [$\mu\text{g/l}$]	uNGAL/uCr; [$\mu\text{g/g}$]	uNGAL; [$\mu\text{g/l}$]	uNGAL/uCr; [$\mu\text{g/g}$]
nadciśnienie tętnicze	19,9 (8,8-37,5)	24,0 (9,7-53,7)	20,1 (6,1-51,5)	12,5 (6,0-28,8)
brak nadciśnienia tętniczego	20,3 (14,7-41,6)	18,7 (11,2-39,8)	7,7 (2,6-19,8)	6,4 (5,6-27,9)
p	0,7	0,9	0,2	0,6

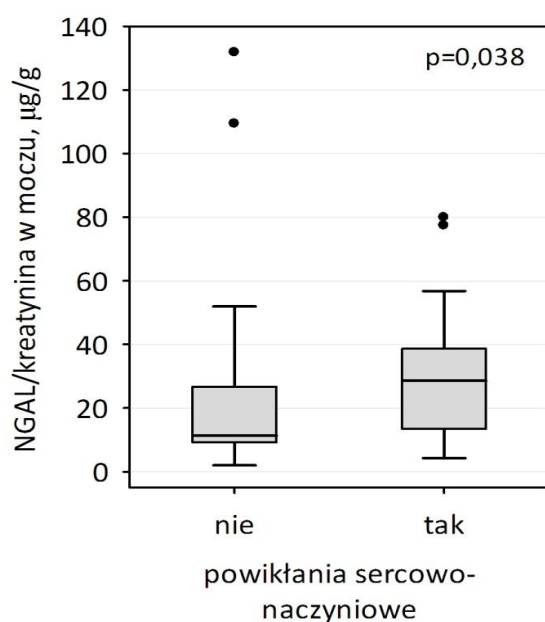
Podobnego związku nie wykazano również po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią. W całej grupie badanej nie wykazano istotnych związków między stężeniem uNGAL (także po korekcie na stężenie kreatyniny) oraz występowaniem powikłań sercowo-naczyniowych (choroba niedokrwienna serca, miażdżycy uogólnionej, niewydolność serca, TIA). Po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią stwierdzono znamienne wyższe wartości wskaźnika uNGAL/uCr w podgrupie pacjentów z powikłaniami sercowo-naczyniowymi (Tabela 17, Rycina 14), a także wyższe stężenia uNGAL u pacjentów z niewydolnością serca i miażdżycą uogólnioną (Tabela 18). Nie stwierdzono zależności między stężeniem uNGAL i uNGAL/uCr oraz występowaniem powikłań sercowo-naczyniowych u osób z grupy kontrolnej ($p=0,7$ i $p=0,2$).

Tabela 17.

Wskaźnik uNGAL/uCr [$\mu\text{g/g}$] u pacjentów z DMt2 i rozpoznanymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi w porównaniu z pozostałymi pacjentami (z wyłączeniem osób z leukocyturią).

	Liczba pacjentów z danym rozpoznaniem	Wskaźnik uNGAL/u u chorych z danym rozpoznaniem	Wskaźnik uNGAL/uCr u chorych bez danego rozpoznania	p
powikłania sercowo-naczyniowe*	18	28,6 (13,4-38,6)	11,4 (9,2-26,7)	0,038
choroba niedokrwienna serca	16	28,5 (12,4-36,0)	12,1 (9,2-28,1)	0,1
niewydolność serca	6	32,4 (14,5-38,6)	13,4 (9,5-29,1)	0,2
miażdżycza uogólniona	5	31,4 (27,9-33,4)	13,9 (9,5-31,3)	0,4

*pacjenci z chorobą niedokrwienną serca, niewydolnością serca, miażdżycą uogólnioną i TIA

**Rycina 14.**

Wartości wskaźnika uNGAL/uCr w grupie badanej u pacjentów z powikłaniami sercowo-naczyniowymi i bez takich powikłań (bez chorych z leukocyturią). Dane przedstawiono jako medianę, dolny-górny kwartył (ramka), minimum-maksimum nieodstających (wąsy) oraz wartości odstające (punkty).

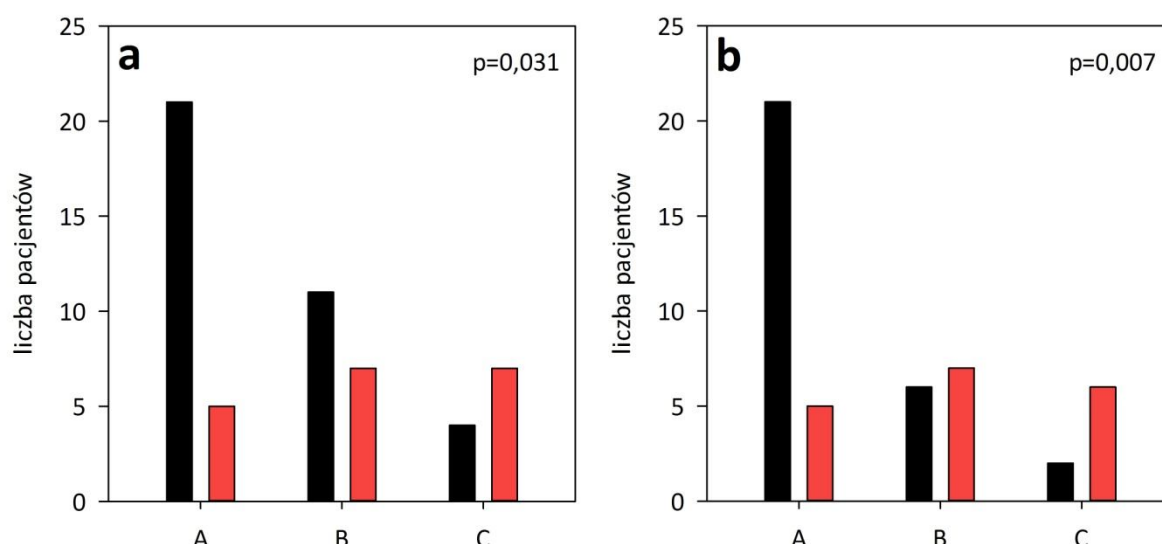
Tabela 18.

Stężenia uNGAL [$\mu\text{g/l}$] u pacjentów z DMt2 i rozpoznanymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi w porównaniu z pozostałymi pacjentami (z wyłączeniem osób z leukocyturią).

	Liczba pacjentów z danym rozpoznaniem	Stężenie uNGAL u chorych z danym rozpoznaniem	Stężenie uNGAL u chorych bez danego rozpoznania	p
powikłania sercowo-naczyniowe*	18	21,6 (10,4-32,4)	15,8 (7,7-21,1)	0,2
choroba niedokrwienna serca	16	21,6 (10,4-31,0)	17,0 (7,7-22,0)	0,4
niewydolność serca	6	27,6 (20,8-46,8)	17,0 (7,7-22,3)	0,048
miażdżycy uogólnionej	5	29,6 (22,3-32,4)	16,4 (7,7-23,3)	0,041

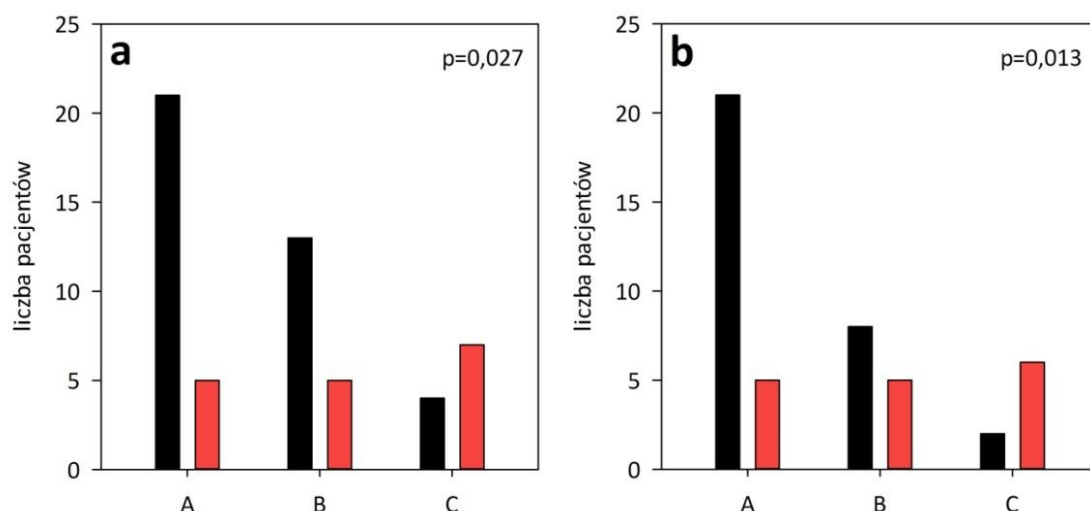
*pacjenci z chorobą niedokrwienną serca (w tym z NSTEMI w wywiadzie), niewydolnością serca, miażdżycą uogólnioną i TIA.

Zaobserwowano różnice dotyczące częstości występowania powikłań sercowo-naczyniowych między poszczególnymi podgrupami pacjentów wyróżnionymi na podstawie uNGAL/uCr oraz UACR. W podgrupie z wysokimi wartościami UACR (podgrupa C; większość z tych pacjentów miała również wysokie wartości uNGAL/uCr), 64% pacjentów stanowiły osoby z powikłaniami sercowo-naczyniowymi. W podgrupie z niską wartością wskaźnika UACR i wysoką uNGAL/kuCr (podgrupa B) pacjenci z powikłaniami sercowo-naczyniowymi stanowili 39% osób. Jednocześnie pacjenci ci stanowili jedynie 19% podgrupy z niskimi wartościami wskaźników uNGAL/uCr i UACR (podgrupa A) ($p=0,030$). Po wyłączeniu pacjentów z leukocyturią, różnice między podgrupami były również istotne statystycznie: podgrupy A, B i C liczyły odpowiednio 19, 54 i 75% osób z rozpoznanymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi ($p=0,007$) (Rycina 15).

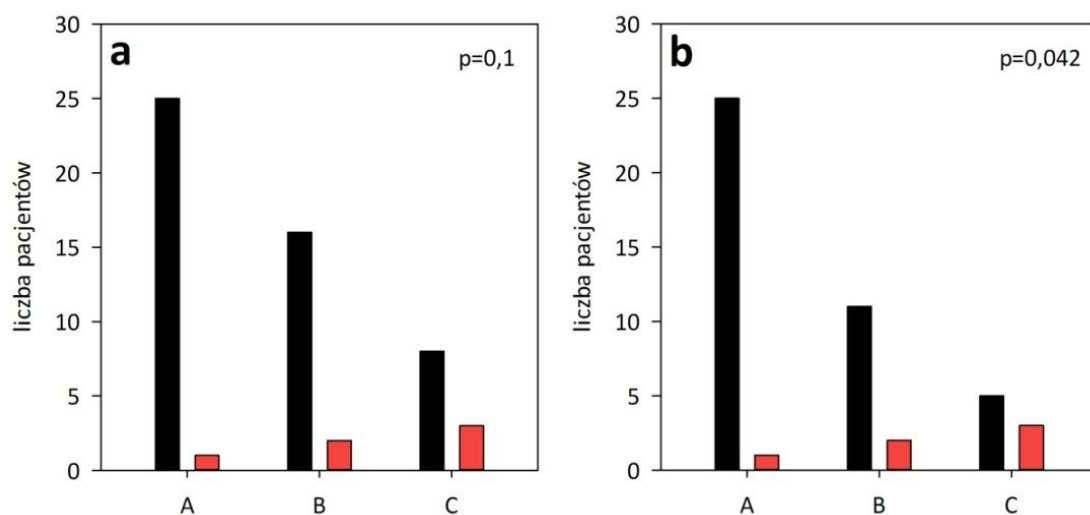


Rycina 15. Liczba chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowymi (czerwone słupki) oraz bez powikłań (czarne słupki) w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR (A – niskie wartości obu wskaźników, B – niskie wartości wskaźnika UACR i wysokie wartości uNGAL/uCr, C – wysokie wartości obu wskaźników) w całej grupie badanej (a) i po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią (b).

Różnice między podgrupami A, B i C obserwowano również w odniesieniu do poszczególnych powikłań sercowo-naczyniowych. W podgrupie C, blisko 64% pacjentów stanowiły osoby z rozpoznaną chorobą niedokrwienną serca, w podgrupie A 19%, a w podgrupie B 28% ($p=0,027$). Podobne różnice obserwowano po wykluczeniu z grupy badanej osób z leukocyturią. Pacjenci z chorobą niedokrwienną serca stanowili 19% podgrupy A, 38% podgrupy B i 75% podgrupy C; $p=0,013$ (Rycina 16). Pacjenci z rozpoznaniem niewydolności serca stanowili odpowiednio 4%, 11% i 27% podgrup A, B i C. W tym przypadku różnice między podgrupami nie były istotne statystycznie ($p=0,1$). Różnice istotne statystycznie wykazano po wykluczeniu osób z leukocyturią (niewydolność serca rozpoznano odpowiednio u 4, 15 i 38% pacjentów w podgrupach A, B i C; $p=0,042$) (Rycina 17). Największy odsetek pacjentów z miażdżycą uogólnioną obserwowano w podgrupie B (17%), w podgrupie A 4% i 9% w podgrupie C ($p=0,3$ i $p=0,2$).



Rycina 16. Liczba chorych z chorobą niedokrwienną serca (czerwone słupki) oraz bez choroby niedokrwiennej serca (czarne słupki) w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR (A – niskie wartości obu wskaźników, B – niskie wartości wskaźnika UACR i wysokie wartości wskaźnika uNGAL/uCr, C –wysokie wartości obu wskaźników) w całej grupie badanej (a) i po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią (b).



Rycina 17. Liczba chorych z niewydolnością serca (czerwone słupki) oraz bez niewydolności serca (czarne słupki) w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR (A – niskie wartości obu wskaźników, B – niskie wartości wskaźnika albumina/kreatynina i wysokie wartości wskaźnika uNGAL/uCr, C –wysokie wartości obu wskaźników) w całej grupie badanej (a) i po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią (b).

W oparciu o ocenę wielokrotnej analizy regresji logistycznej i po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią, wysokie wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR (podgrupa B lub C) były czynnikiem predykcyjnym powikłań sercowo-naczyniowych w badanej grupie chorych, niezależnie od wieku, płci, czasu trwania DMt2, BMI, obecności nadciśnienia tętniczego i hiperlipidemii. Model regresji logistycznej przedstawiono w Tabeli 19.

Tabela 19.

Model regresji logistycznej w prognozowaniu powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów z DMt2 (z wyłączeniem osób z leukocyturią).

Zmienne niezależne	Iloraz szans (95% przedział ufności)	p
wiek; [lata]	1,11 (0,99-1,25)	0,07
płeć żeńska	0,44 (0,05-3,80)	0,4
czas trwania cukrzycy; [lata]	1,03 (0,84-1,26)	0,8
BMI; [kg/m ²]	1,22 (1,00-1,48)	0,041
nadciśnienie tętnicze	5,21 (0,15-185)	0,3
hiperlipidemia	0,16 (0,02-1,68)	0,1
uNGAL/uCr >21,3 µg/g i UACR <30 mg/g (podgrupa B)	14,99 (1,00-247)	0,049
uNGAL/uCr >21,3 µg/g UACR ≥30 mg/g (podgrupa C)	25,20 (1,01-639)	0,042
dopasowanie modelu	chi ² (8)=19,8; p=0,011	

Zbiorcze podsumowanie charakterystyki podgrup chorych różniących się wartościami wskaźników uNGAL/uCr i UACR przedstawia Tabela 20.

Tabela 20.

Zbiorcze podsumowanie charakterystyki podgrup chorych z DMt2 różniących się wartościami wskaźników uNGAL/uCr i UACR.

podgrupy	A	B	C
Odsetek chorych [%]	niskie wartości obu wskaźników* (47)	niska wartość UACR i wysoka wartość uNGAL/uCr*(33)	wysokie wartości obu wskaźników* (11)
średnia wartość uNGAL/uCr [ug/g]	11,2	42,1	29,6
odsetek kobiet [%] (p=0,037)	31	41	28
średni czas trwania DMt2 w latach (p=0,017)	7	4	10,5
odsetek chorych bez leukocyturii (%)	55	28	17
średnia wartość HbA1c (p=0,5)	7,7	8,7	8,6
Średnie stężenie triglicerydów [mg/dl]	142	185	280
odsetek chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowymi [%] (p=0,030)	19	39	64
odsetek chorych z niewydolnością mięśnia serca [%] (p=0,042)	4	15	38
Odsetek chorych z chorobą niedokrwienną serca [%] (p=0,027)	19	28	64

*niski wskaźnik NGAL/kreatynina t.j. < mediany (21,3 µg/g), niski UACR t.j. <30 mg/g, wysoki wskaźnik NGAL/kreatynina t.j. >mediany (21,3 µg/g), wysoki UACR t.j. >30 mg/g

^ pod warunkiem, że nie są spełnione inne kryteria PChN jak występowanie nieprawidłowości w składzie biochemicznym i/lub osadzie moczu i/lub nieprawidłowe wartości wskaźników uszkodzenia nerek we krwi i/lub w badaniach obrazowych nerek albo dróg moczowych [228].

6. DYSKUSJA

W pracy analizie poddano zmiany stężenia NGAL (uNGAL) oraz wskaźnika NGAL do kreatyniny (uNGAL/uCr) oznaczane w pojedynczej porannej próbce moczu w populacji chorych z DMt2 i zagrożonej CChN, a otrzymane wyniki porównywano z danymi uzyskanymi od grupy kontrolnej. Poszukiwano również istotnych korelacji oraz oceniano znaczenie innych czynników modyfikujących stężenie uNGAL oraz uNGAL/uCr. W dalszej części badania określono wpływ wybranych czynników na wydalanie uNGAL oraz wartość wskaźnika uNGAL/uCr w badanej populacji, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania tego biowskaźnika we wczesnej diagnostyce uszkodzenia nerek u chorych z DMt2 oraz jego korelacji z powikłaniami sercowo-naczyniowymi. W toku analizy, chorych z DMt2 podzielono na 3 podgrupy różniące się parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi, mając na uwadze podstawy do wdrożenia odmiennych działań leczniczych w poszczególnych podgrupach w celu zahamowania postępu CChN. Przeanalizowano również związek między wskaźnikami uNGAL i uNGAL/uCr oraz czasem trwania i stopniem wyrównania DMt2. W wyniku analizy statystycznej oceniono również wpływ leczenia hipolipemizującego oraz hamującego układ RAA na stężenie uNGAL oraz uNGAL/uCr. W ostatniej części badania omówiono niezależne czynniki predykcyjne dla zmiany stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr w badanej grupie chorych.

Grupy badana i kontrolna były zbliżone pod względem płci i wieku, nie różniły się również istotnie, jeśli chodzi o udział procentowy pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, chorobą niedokrwienną serca, miażdżycą uogólnioną, niewydolnością serca oraz wartości eGFR wyliczone na podstawie wzoru CKD-EPI. Pacjenci z cukrzycą mieli wyższe wartości BMI, co jest zgodne z danymi literaturowymi mówiącymi, że DMt2 częściej występuje u osób z wyższą masą ciała [24]. Piśmiennictwo dotyczące NGAL podkreśla jego związek z układem immunologicznym, zjawiskiem oporności na insulinę i procesami zapalnymi mającymi wpływ na przebieg CChN [18,224]. Uogólniony proces zapalny oraz niedokrwistość mogą prowadzić do wzrostu stężenia NGAL, ponieważ lipokalina ta jest białkiem uwalnianym z neutrofili i makrofagów, a jej zasadnicza funkcja biologiczna związana jest z regulacją metabolizmu żelaza [54,62,130]. W obecnym badaniu nie zaobserwowano wpływu wielkości leukocytozy oraz zmian stężenia hemoglobiny na stężenia uNGAL oraz wielkość uNGAL/uCr. W obu grupach stężenia lipidów tj.: cholesterolu całkowitego i we frakcji LDL oraz triglicerydów nie różniły się z wyjątkiem cholesterolu

HDL, nieco wyższego w grupie kontrolnej. Spostrzeżenie to jest spójne z wiedzą mówiącą o bardziej aterogennym profilu lipidowym u chorych z DMt2 [50]. W grupie badanej stężenia uNGAL były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną, jednak istotną statystycznie różnicę zaobserwowano tylko dla wskaźnika uNGAL/uCr. Obserwacje te są zgodne z badaniami Bolignano i wsp. [18], Fu i wsp. [58] oraz Wu i wsp. [220] przeprowadzonymi w grupie chorych z DMt2.

W toku badania wykazano, że stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr korelowały dodatnio ze stężeniem albuminy w moczu i wskaźnikiem UACR w całej grupie badanej. Zwiększone wydalanie albuminy z moczem pozostaje uznanym czynnikiem ryzyka PChN i CChN [94,229], stąd też wykazanie dodatniej korelacji pomiędzy uNGAL i uNGAL/uCr w moczu i albuminurią potwierdza fakt, że badane biowskaźniki mogą zostać uznane za wyznaczniki uszkodzenia nerek u chorych z DMt2. Zależności takiej nie stwierdzono w grupie kontrolnej. Spostrzeżenia te potwierdzają badania prowadzone przez Nielsena i wsp. [148], w którym podczas 3,5 letniej obserwacji w grupie 177 chorych z DMt2 i prawidłowym eGFR zaobserwowano korelację pomiędzy uNGAL z albuminurią. Wzrost stężenia uNGAL pozwalał dodatkowo przewidzieć wzrost wydalania albuminy z moczem począwszy od „mikroalbuminurii” do „makroalbuminurii”, a wyższe stężenia uNGAL były związane z szybszym pogarszaniem się funkcji nerek [148].

W obecnym badaniu w grupie pacjentów z DMt2 wyróżniono trzy podgrupy różniące się wartościami wskaźników uNGAL/uCr i UACR w moczu. Przyjmując mieszczący się poniżej 95. percentyla w grupie kontrolnej ($<38\mu\text{g/g}$) oraz powyżej mediany ($21,3\ \mu\text{g/g}$) wskaźnik uNGAL/uCr w moczu chorych w grupie badanej za parametr uszkodzenia cewek nerkowych, a wskaźnik UACR za parametr uszkodzenia kłębuszków nerkowych, zaskakująca staje się zbieżność danych uzyskanych przez autorkę pracy z danymi uzyskanymi z badań histopatologicznych biopłatów nerek osób z „mikroalbuminurią” w przebiegu DMt2. W badaniu Brocco i wsp. [19], w którym analizowano wyniki biopłatów nerek pochodzące od 53 chorych z cukrzycą insulinoniezależną (nomenklatura z 1997r.) obserwowane w obrazach histopatologicznych zmiany w nerkach, podzielono na 3 klasy. W pierwszej z nich znajdowało się 41% badanych z prawidłowym obrazem nerek lub zmianami określanymi jako minimalne, w grupie drugiej znalazło się 26% chorych, u których występowały typowe dla cukrzycy zmiany z uszkodzeniem kłębuszków nerkowych, u chorych tych stwierdzano również retinopatię proliferacyjną. W grupie trzeciej, liczącej 33% chorych, zmiany miały charakter zapalenia cewek z zajęciem śródmiąższu nerek.

Zestawiając dane uzyskane przez autorkę pracy z badaniem Brocco i wsp. [19] nasuwa się wniosek, iż wartości biowskaźników uNGAL/uCr oraz UACR rozpatrywane łącznie z eGFR korelują z histopatologicznym obrazem biopłatów nerek u chorych z DMt2. Grupy I, II i III z badania Brocco i wsp. [19] odpowiadają podgrupom A, C i B w obecnym badaniu. Dla ułatwienia wnioskowania, zaobserwowane zależności podsumowano w Tabeli 21 i zamieszczono na końcu rozdziału. Jednocześnie wyjaśnienia wymaga istniejąca rozbieżność odsetkowa w liczebności chorych w podgrupach I vs A oraz II vs C. Rozbieżność ta może wynikać z faktu, że ocena histopatologiczna biopłatów nerek prowadzona była w grupie chorych z wyższą albuminurią, w stosunku do założeń obecnego badania, stąd również większy odsetek chorych z uszkodzeniem kłębuszków nerkowych. Podobne zmiany w obrazach histopatologicznych biopłatów nerek obserwowano w 34 osobowej grupie chorych z „mikroalbuminurią”, eGFR>60 ml/min oraz towarzyszącą cukrzycą insulinoniezależną (nomenklatura z 1996r.) w badaniu Fioretto i wsp. [52]. Na podstawie podziału grupy pacjentów z DMt2 w zależności od wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR przy eGFR≥60ml/min/1,73m², autorka pracy proponuje, aby w klasyfikacji uszkodzenia nerek w przebiegu DMt2 wyłonić następujące trzy grupy:

Grupę A - niskie wartości obu wskaźników, brak PChN u chorego z DMt2, pod warunkiem, że nie są spełnione inne kryteria PChN [228]

Grupę B - niska wartość UACR i wysoka wartość uNGAL/uCr - PChN G1/A1 lub G2/A1 z uszkodzeniem cewek nefronów u chorego z DMt2

Grupę C - wysokie wartości obu wskaźników, CChN G1/A2 lub G2/A2 według obowiązujących kryteriów rozpoznania [97,228]

W celu lepszego zobrazowania zaproponowanej klasyfikacji, opisane dane zamieszczono w Tabeli 22 znajdującej się na końcu rozdziału. Klasyfikacja ta oceniana łącznie z danymi zawartymi w Tabeli 20, pozwala na zaproponowanie zróżnicowania postępowania klinicznego skierowanego na nefroprotekcję w poszczególnych grupach chorych z DMt2. Proponuje się, aby w podgrupie A zapobieganie uszkodzeniu nerek i leczenie chorób współistniejących prowadzić zgodnie z wytycznymi, jak w populacji bez DMt2. W podgrupie B za istotną uważa się poprawę wyrównania glikemii oraz leczenie powikłań sercowo-naczyniowych ze szczególnym uwzględnieniem populacji kobiet. W podgrupie C istotne działania lecznicze powinny uwzględniać poprawę wyrównania glikemii, zastosowanie blokady RAA u chorych z nadciśnieniem tętniczym, skuteczne leczenie hipolipemizujące oraz leczenie powikłań sercowo-naczyniowych.

We wszystkich grupach chorych z DMt2 zalecane jest ponadto działanie zmierzające do normalizacji masy ciała, optymalnego leczenia nadciśnienia tętniczego, regularnego wysiłku fizycznego oraz zaprzestania palenia papierosów. Zalecenia te są zgodne z wytycznymi PTD [229].

U chorych z DMt2 zaobserwowano istotną statycznie ujemną korelację między wzrostem wartości uNGAL/uCr oraz spadkiem stężenia kreatyniny w surowicy. Zależność ta może wynikać z hiperfiltracji we wczesnym okresie rozwoju CChN, która prowadzi do zmniejszenia stężenia kreatyniny w surowicy krwi oraz zwiększenia wydalania kreatyniny z moczem. Wzrost wartości mianownika w ilorazie stężenia uNGAL do uCr tłumaczy w tej sytuacji klinicznej wzrost wskaźnika uNGAL/uCr. Dotychczasowe badania wskazują, że NGAL koreluje z gorszym przebiegiem i progresją PChN i wykazuje odwrotną zależność z wielkością eGFR [64-65,75-76]. W badaniu Bolignano i wsp. [18], przeprowadzonym w grupie chorych z DMt2 wykazano, że zarówno NGAL oznaczany w moczu, jak i w surowicy jest lepszym wskaźnikiem w ocenie progresji PChN, niż eGFR w okresie 18,5 miesięcznej obserwacji. W badaniu przeprowadzonym przez autorkę pracy, zarówno w grupie z DMt2, jak i w grupie kontrolnej nie wykazano zależności między stężeniem uNGAL a kreatyniną w surowicy, ani też między stężeniem uNGAL i wskaźnikiem uNGAL/uCr oraz wielkością eGFR. Wyniki te różnią się od wyników pochodzących z innych badań, w których wykazywano obecność istotnej statystycznie korelacji między wskaźnikiem uNGAL/uCr a eGFR [28,58,148,220]. Wykazana rozbieżność może wynikać z faktu, że w przytoczonych badaniach wartości GFR były niższe od badań autorki, mniejszej liczebności grupy badanej oraz oceny eGFR za pomocą różnych wzorów. We wcześniejszych badaniach filtrację kłębuszkową szacowano na podstawie wzoru eGFR MDRD, który u osób z eGFR powyżej 60ml/min jest uznawany za mniej dokładny od eGFR CKD-EPI, stosowany przez autorkę [94]. Aby właściwie ocenić przytoczone rozbieżności potrzeba dalszych badań na większej grupie chorych z DMt2 oraz podwyższonym ryzykiem CChN.

W oparciu o uzyskane wyniki oraz dane literaturowe zaobserwowano, że wskaźniki uNGAL i uNGAL/uCr spełniają cechy przydatnego klinicznie biowskaźnika uszkodzenia nerek w DMt2 [113]. Pierwszą z nich jest specyficzność dla uszkodzenia nerek. Wskaźniki uNGAL i uNGAL/uCr u chorych bez aktywnego zakażenia, istotnej niedokrwistości, choroby nowotworowej i chorób autoimmunologicznych wykazują wysoką specyficzność dla uszkodzenia nerek. Potwierdza to wykazana przez autorkę dodatnia korelacja pomiędzy zmianą ich stężenia oraz albuminurią i UACR (wskaźniki uznawane za markery specyficzne dla uszkodzenia nerek).

Drugą istotną cechą jako biomarkera jest ich zdolność do różnicowania, która struktura nefronu została uszkodzona. uNGAL i uNGAL/uCr są specyficzne dla uszkodzenia komórek cewki nefronu, co potwierdzono wykazując znaczny wzrost stężenia obu markerów w moczu chorych po podaniu środka kontrastowego podczas tomografii komputerowej. Hiperosmolalny środek kontrastowy uszkadza cewki nefronów, mimo zastosowania leczenia zapobiegającego nefropatii po jego podaniu (ang. *contrast induced nephropathy*; CIN). Obserwacja ta jest zgodna z wynikami innych badań [76,110,194]. Uzyskane w toku badania dane potwierdzają również przydatność kliniczną pomiaru stężenia uNGAL w rozpoznaniu nefropatii pokontrastowej.

W oparciu o wyniki przeprowadzonego badania wydaje się, że oznaczając eGFR, UACR oraz uNGAL/uCr możliwe jest określenie miejsca uszkodzenia nefronu (kłębuszki lub cewki). W literaturze nie znaleziono dostępnych badań potwierdzających to spostrzeżenie. Zaskakująca jest zbieżność zebranych w pracy doktorskiej danych z oceną histopatologiczną biopsatów nerek osób z albuminurią <300mg/g, eGFR>60ml/min i współistniejącą cukrzycą insulinoniezależną (nomenklatura z 1996r.) [19,52]. W toku badania zaobserwowano, że stężenie uNGAL u 33% populacji chorych z DMt2 wzrasta przed pojawieniem się albuminurii uznawanej za wczesny marker uszkodzenia nerek. W badaniu Kim i wsp. [99] potwierdzono również istotną rolę oznaczenia uNGAL we wczesnej diagnostyce CChN.

Pomiar stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr mogą dostarczać informacji na temat uszkodzenia nerki i zmieniają się dynamicznie w czasie wraz ze wzrostem stopnia tego uszkodzenia. Nie wykazano istotnych różnic dotyczących zmiany stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr między grupą chorych ze świeżo wykrytą cukrzycą, a pozostałymi pacjentami. Istnieje prawdopodobieństwo, że spostrzeżenia te wynikają z faktu późnego rozpoznawania DMt2, najczęściej po upływie kilku lat od faktycznego rozpoczęcia choroby. Oszacowanie czasu trwania tego typu cukrzycy i skojarzenie go ze stopniem uszkodzenia nerek oraz powikłaniami sercowo-naczyniowymi jest więc trudne i zwykle orientacyjne. Zauważono natomiast, że czas trwania cukrzycy był istotnie dłuższy u pacjentów z wysokimi wartościami uNGAL/uCr i UACR (podgrupa C; mediana 10,5 lat) w porównaniu z pacjentami z niskimi wartościami wskaźnika UACR i wysokimi wartościami uNGAL/uCr (podgrupa B; mediana 4,0 lata). Obserwacje te korespondują z wiedzą na temat pogarszającej się funkcji nerek mierzonej wzrostem albuminurii wraz z upływem czasu trwania choroby u części chorych z DMt2 [40-41].

Dodatkowym interesującym spostrzeżeniem w omawianej pracy jest wykazanie wyższych wartości wskaźnika uNGAL/uCr u chorych z najkrótszym czasem trwania DMt2. Obserwacja

ta może sugerować występowanie u części chorych predyspozycji do uszkodzenia komórek cewek nefronów przed wzrostem albuminurii i obniżeniem się filtracji kłębuszkowej. W tym kontekście uNGAL/uCr może być uznany za wczesny biowskiąznik uszkodzenia nerek u chorych z DMt2. W celu oceny przybliżonego momentu uszkodzenia nerek w DMt2 konieczne jest określenie wartości progowej uNGAL oraz uNGAL/uCr i podjęcie próby oceny korelacji tych wartości z postępem choroby. W obecnym badaniu wartość progowa dla wskaźnika w moczu, powyżej której pojawia się uszkodzenie komórek cewek nefronów wynosiła 21,3µg/g. W badaniu Assal i wsp. [5], czułość diagnostyczna oznaczeń uNGAL jako predyktora uszkodzenia nerek w DMt2 przy obecności „mikroalbuminurii” wynosiła 66,7%, natomiast dla „makroalbuminurii”: 70,6% (swoistość diagnostyczna wynosiła odpowiednio: 88,9% i 83,3%). Ważną zaletą oznaczeń uNGAL i uNGAL/uCr jest ich nieinwazyjność i łatwy sposób pozyskiwania materiału, bez konieczności dokonywania dobowej zbiórki moczu. Pomiary wskaźnika uNGAL/uCr i oznaczenie stężenia uNGAL w pojedynczej porannej próbce moczu prowadzi się przy użyciu zautomatyzowanego testu dostępnego komercyjnie przy użyciu nowoczesnej platformy immunochemicznej.

W badaniu zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy zmianą wartości uNGAL oraz uNGAL/uCr wraz ze stopniem wyrównania DMt2 określanym wartością HbA_{1c}. Można wysnuć wniosek, że stopień wyrównania cukrzycy koreluje z wartością omawianych wskaźników, a utrzymująca się hiperglikemia uszkadza komórki cewki nerkowej u części chorych z DMt2 przed pojawieniem się albuminurii uznawanej obecnie za pierwszy objaw CChN. Ten patomechanizm uszkodzenia nerek w DMt2 zaproponował po raz pierwszy Tang i wsp. [192] prowadząc badanie na ludzkich komórkach cewki proksymalnej *in vitro*. Stężenie uNGAL oraz uNGAL/uCr koreluje również z UACR uznanym (łącznie z eGFR) za złoty standard w ocenie funkcji nerek w przebiegu DMt2 [94,148,192].

Na podstawie analizy wielokrotnej regresji logistycznej, po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią, wysokie wartości wskaźnika uNGAL/uCr okazały się być wartościowym czynnikiem predykcyjnym powikłań sercowo-naczyniowych w badanej grupie chorych, niezależnie od wieku, płci, czasu trwania DMt2, BMI, obecności nadciśnienia tętniczego i hiperlipidemii. Spostrzeżenie to potwierdza ważną z punktu widzenia lekarza praktyka użyteczność wskaźnika uNGAL/uCr w szacowaniu ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych u chorych ze zwiększonym ryzykiem CChN. Jednocześnie nie stwierdzono zależności między stężeniem uNGAL oraz uNGAL/uCr a występowaniem powikłań sercowo-naczyniowych u osób bez DMt2. W kontekście uzyskanych wyników należy uznać, że wskaźnik uNGAL/uCr może służyć do oceny ryzyka schorzeń sercowo-naczyniowych u chorych z DMt2, podobnie

jak UACR. Wyniki te są spójne z obserwacją Hasegawa i wsp. [70], którzy zauważyli, że uNGAL może zostać uznany za czynnik predykcyjny powikłań sercowo-naczyniowych u chorych z DMt2 [70]. Również w badaniu Helmersson-Karlqvist i wsp. [72] potwierdzono, że uNGAL jest biopskaźnikiem powikłań sercowo-naczyniowych, a także śmiertelności [72].

Uzyskane przez autorkę wyniki badań nie potwierdziły istnienia zależności między stężeniem uNGAL oraz uNGAL/uCr, a obecnością nadciśnienia tętniczego zarówno u pacjentów z DMt2, jak i w grupie kontrolnej. Obserwacja ta pokrywa się z danymi pochodzącymi z badania Prkacin i wsp. [168], w którym u chorych z opornym nadciśnieniem tętniczym, nie stwierdzono związku między uNGAL i wielkością eGFR. W pracy Małyszko i wsp. [118] stężenie uNGAL wzrastało u chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z pacjentami o prawidłowym ciśnieniu tętniczym. Podczas monitorowania stężenia uNGAL jako biopskaźnika AKI należy uwzględnić obecność przewlekłego nadciśnienia tętniczego, które może powodować nieznaczny wzrost uNGAL, niezależnie od uszkodzenia kanalik nerkowego [43,117]. W obecnym badaniu, nie obserwowano wyżej wymienionych zależności, co mogło być związane z wykluczeniem z badania chorych ze źle kontrolowanym farmakologicznie nadciśnieniem tętniczym.

Stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr nie różniły się istotnie między pacjentami leczonymi preparatami hamującymi układ RAA oraz pozostałymi chorymi. Wyniki te mogą sugerować brak wpływu blokady RAA na funkcjonowanie cewek nefronów w przebiegu DMt2. Brak wpływu farmakoterapii z zastosowaniem leków z grupy ACEI na stężenie uNGAL u chorych z DMt2 oraz prawidłową filtracją kłębuszkową i „mikroalbuminurią”, zauważył Nielsen i wsp. [149].

Stężenia cholesterolu całkowitego oraz we frakcji LDL i triglicerydów korelowały ze wskaźnikiem uNGAL/uCr w grupie chorych na DMt2. Ponadto, stężenia triglicerydów różniły się istotnie między podgrupami A (z niskimi wartościami obu wskaźników) i C (z wysokimi wartościami obu wskaźników) pacjentów wyróżnionymi na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr i UACR. Wyniki te mogą wskazywać na wpływ aterogenego lipidogramu w grupie z DMt2 na progresję uszkodzenia nerek u chorych z albuminurią >30mg/g (grupa C w obecnym badaniu). Obserwacja ta jest spójna z badaniem Gall i wsp. [59], w którym wykazano korelację między stężeniem cholesterolu w surowicy a progresją CChN szacowanej wartością eGFR. Autorka pracy zauważyła, że zarówno w grupie badanej, jak i w kontrolnej leczenie statynami nie miało wpływu na stężenie uNGAL oraz uNGAL/uCr. Ponadto, w grupie badanej pacjenci z leukocyturią mieli istotnie statystycznie wyższe stężenia triglicerydów w porównaniu z chorymi bez leukocyturii. Istnieje pogląd, że

dyslipidemia przyspiesza postęp PChN, jaką jest CChN. Proces ten rozpoczyna się od uszkodzenia włósniczek kłębuszka nerkowego, które umożliwia infiltrację mezangium lipoproteinami [133]. Prawdopodobne jest, że ten proces zainicjowany przez hiperlipidemię, leży u podłoża zapalenia śródmiąższu nerek u chorych z DMt2 z konsekwencjami pod postacią jałowej leukocyturii. W trakcie analizy danych zaobserwowano, że obecność leukocyturii wpływa na zwiększenie stężenia uNGAL i uNGAL/uCr badanych chorych, co najprawdopodobniej związane jest z bezpośrednią produkcją tego białka przez neutrofile obecne w moczu [30]. Obecność leukocyturii, która okazała się niezależnym czynnikiem predykcyjnym dla zmiany stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr, bez względu na jej pochodzenie, stanowi czynnik ograniczający przydatność zastosowania badanych biowskaźników do oceny ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych w grupie chorych z DMt2. Jednocześnie leukocyturia nie ogranicza zastosowania uNGAL i uNGAL/uCr do oceny funkcji nerek ponieważ nie wpływa na korelację tych biowskaźników z albuminurią [94]. W opinii autorki pracy, obserwacja ta powinna znaleźć odniesienie w dalszych badaniach na liczniejszej grupie chorych, natomiast na podstawie dotychczasowych obserwacji u chorych z leukocyturią uzasadnione wydaje się ustalenie wyższych wartości progowych dla uNGAL oraz uNGAL/uCr.

W grupie z DMt2, obserwowano ponadto wyższe wartości wskaźnika uNGAL/uCr u kobiet w porównaniu z mężczyznami. Wyższe wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR u kobiet z PChN w stadium G1/A1 lub G2/A2 mogą wynikać ze zwiększonej predyspozycji do uszkodzenia nerek w przebiegu DMt2 związanej z płcią w tej grupie chorych. Spostrzeżenie to jest zgodne z wynikami badania UKPDS, w którym zaobserwowano, że u kobiet z DMt2 filtracja kłębuszkowa jest mniejsza mimo braku albuminurii [172]. Jednak w innym badaniu w grupie Indian Pima [164], u których stwierdzono genetyczną predyspozycję do DMt2 zaobserwowano, że mężczyźni chorzy na cukrzycę mogą być bardziej podatni na rozwój uszkodzenia nerek w porównaniu z kobietami. Dane literaturowe dotyczące związanej z płcią predyspozycji do CChN są więc sprzeczne. Warto zaznaczyć, że w obecnym badaniu, w grupie chorych na DMt2, przeciętny czas trwania cukrzycy był ponad dwukrotnie dłuższy u kobiet niż u mężczyzn, co również może tłumaczyć obserwowany w trakcie badania wzrost biowskaźników uszkodzenia nerek w moczu w grupie kobiet z DMt2.

W badaniu potwierdzono, że wiek chorych z DMt2 może być niezależnym czynnikiem predykcyjnym dla zmiany stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr. Podobne obserwacje potwierdziło badanie Pennemans i wsp. [162] wykazując istnienie zależności pomiędzy uNGAL i uNGAL/uCr oraz wiekiem badanych osób. Na podstawie tych obserwacji

wysunięto postulat o konieczności szacowania wartości omawianych wskaźników z uwzględnieniem wieku i płci chorych, analogicznie do zmiennych przy obliczaniu eGFR MDRD czy CKD-EPI [162].

Tabela 21.

Zależność pomiędzy uszkodzeniami strukturalnymi obserwowanymi w biopsatach nerek chorych na DMt2 wg Brocco i wsp. [19], z wartościami biowskaźników uNGAL/uCr i UACR u chorych z DMt2 w obecnym badaniu.

Rodzaj uszkodzeń nerek w przebiegu DMt2 stwierdzany w badaniu Brocco i wsp. [19]	Podgrupy różniące się wartościami wskaźników uNGAL/uCr i UACR w moczu w obecnym badaniu
I - prawidłowy obraz nerek lub zmiany minimalne (41%) ^	A - niskie wartości obu wskaźników* (47%)^
II - typowe zmiany dla cukrzycy z uszkodzeniem kłębuszków nerkowych (26%)^	C - wysoka wartość obu wskaźników* (11%)^
III - zmiany o typie zapalenia cewek i zajęcia śródmiąższu nerek (33%)^	B - niska wartość wskaźnika UACR, wysoka wartość wskaźnika uNGAL/uCr * (33%)^

*niski wskaźnik NGAL/kreatynina tj. < mediany (21,3 µg/g), niski wskaźnik albumina/kreatynina tj. <30mg/g, wysoki wskaźnik NGAL/kreatynina tj. >mediany (21,3µg/g), wysoki wskaźnik albumina/kreatynina tj. >30 mg/g; ^ w nawiasach podano odsetek chorych w poszczególnych grupach

Tabela 22.

Podgrupy chorych różniące się wartościami wskaźników uNGAL/uCr i UACR wraz z proponowaną klasyfikacją uszkodzenia nerek w przebiegu DMt2.

podgrupy	A	B	C
wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR	niskie wartości obu wskaźników*	niska wartość UACR i wysoka wartość uNGAL/uCr*	wysokie wartości obu wskaźników*
proponowana klasyfikacja uszkodzenia nerek	bez PChN u chorego z DM t2 [^]	PChN G1/A1 lub G2/A1 [°] z uszkodzeniem cewek nefronów u chorego z DMt2	CChN G1/A2 lub G2/A2 [°]

*niski wskaźnik NGAL/kreatynina tj. < mediany (21,3 µg/g), niski UACR tj. <30 mg/g, wysoki wskaźnik NGAL/kreatynina tj. >mediany (21,3 µg/g), wysoki UACR t.j. >30 mg/g; [^] pod warunkiem, że nie są spełnione inne kryteria PChN jak występowanie nieprawidłowości w składzie biochemicznym i/lub osadzie moczu i/lub nieprawidłowe wartości wskaźników uszkodzenia nerek we krwi i/lub w badaniach obrazowych nerek albo dróg moczowych [229],[°] wg obowiązujących kryteriów [97,229]

7. OGRANICZENIA BADANIA.

Spośród czynników mogących wpływać na pomniejszenie wartości niniejszej pracy wymienić należy przede wszystkim stosunkowo niewielką liczebność grupy. Badanie było finansowane ze środków własnych autora pracy, a znaczący koszt odczynników zakupionych do oznaczania stężenia NGAL w moczu oraz konieczność wyznaczenia wartości referencyjnych dla tego parametru w grupie kontrolnej zdrowych ochotników wpłynął na ograniczenie liczebności badanej grupy. Badana grupa była jednak bardzo dokładnie dobrana i jednorodna pod względem klinicznym.

W badaniu nie oceniono wpływu leków mogących interferować z wynikami badanych wskaźników, wykluczono jednak z badania wszystkich chorych stosujących przewlekle leki o potencjalnym działaniu nefrotoksycznym.

Autorka pracy planuje kontynuowanie dalszych badań u chorych ryzykiem rozwoju CChN w przebiegu DMt2 w celu zwiększenia liczebności badanej grupy oraz walidacji otrzymanych dotychczasowych wyników badań.

8. WNIOSKI.

1. Wykazano znamienne statystyczne wyższe wartości stężenia uNGAL/uCr w porannej porcji moczu u chorych z cukrzycą typu 2 i podwyższonym ryzykiem rozwoju cukrzycowej choroby nerek w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, nie chorujących na cukrzycę. Ponadto, zarówno wartości uNGAL/uCr, jak i uNGAL pozostają zależne od płci i zmieniają się proporcjonalnie do czasu trwania oraz stopnia wyrównania cukrzycy.
2. Wyniki badania wskazują, że u 33% chorych, wzrost stężania NGAL w porannej próbce moczu wyprzedza pojawienie się albuminurii ($>30\text{mg/g}$) uznanej aktualnie za najwcześniejszy marker uszkodzenia nerek. Wydaje się, że wartości stężenia uNGAL/uCr $>21,3\text{ }\mu\text{g/g}$, stanowiące medianę w grupie z DMt2 i mieszczące się poniżej 95. percentyla w grupie kontrolnej ($<38,0\text{ }\mu\text{g/g}$) pozwalają na wczesne przewidywanie uszkodzenia cewek nefronów i korelują z histopatologicznym obrazem bioptatów nerek u chorych z cukrzycą typu 2.
3. Potwierdzono, że zarówno wzrost wartości UACR powyżej 30mg/g , jak i uNGAL/uCr powyżej $21,3\mu\text{g/g}$ są czynnikami predykcyjnymi powikłań sercowo-naczyniowych w badanej grupie niezależnie od wieku, płci, czasu trwania cukrzycy, wartości BMI oraz obecności nadciśnienia tętniczego i hiperlipidemii.
4. W grupie chorych z cukrzycą typu 2, obecność jałowej leukocyturii wpływa na wzrost stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr ograniczając tym samym ich przydatność do oceny ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych.
5. Analogicznie do zmiennych wykorzystywanych do obliczania wielkości eGFR MDRD, czy eGFR-EPI, przy ocenie stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr należy brać pod uwagę wiek oraz płeć pacjenta.
6. Nie wykazano istnienia związku pomiędzy zmianą stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr a stosowaniem leczenia statynami oraz lekami blokującymi układ RAA u chorych ze zwiększonym ryzykiem cukrzycowej choroby w przebiegu cukrzycy typu 2.

9. STRESZCZENIE.

Potrzeba prostego, dokładnego i mało inwazyjnego wskaźnika uszkodzenia nerek, użytecznego w codziennej praktyce klinicznej stanowi cel poszukiwań idealnego biomarkera potwierdzającego wczesny etap rozwoju nefropatii i uzasadniającego wdrożenie wczesnego leczenia zapobiegającego dalszemu uszkodzeniu nerek i konieczności leczenia nerkozastępczego. Lipokalina związana z żelatynazą neutrofili (ang. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL) oznaczana w moczu jest białkiem, które w warunkach prawidłowych ulega swobodnej filtracji przez kłębuszki nerkowe, a następnie jest niemal całkowicie resorbowane w cewkach proksymalnych. Wzrost stężenia NGAL w moczu (uNGAL) może być skutkiem zarówno uszkodzenia cewki bliższej nefronu i zaburzeń resorpcji zwrotnej, ale również może wynikać ze zwiększonej syntezy NGAL na skutek zwiększonej ekspresji mRNA w dystalnej części nefronu.

Celem pracy była ocena przydatności pomiaru stężenia NGAL w moczu we wczesnej diagnostyce cukrzycowej choroby nerek (CChN) w przebiegu cukrzycy typu 2 (DMt2), w szczególności poszukiwanie zależności pomiędzy stężeniem uNGAL, a czasem trwania cukrzycy, stopniem jej wyrównania, obecnością powikłań sercowo-naczyniowych oraz ocena związku pomiędzy zmianą stężenia uNGAL oraz stosowaniem leczenia wpływającego na układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) i gospodarkę lipidową u tych chorych. Do badania zakwalifikowano 55 chorych z DMt2 w wieku powyżej 18 lat ze zwiększonym ryzykiem CChN. Dane porównywano z 22 osobową grupą kontrolną bez cukrzycy. Stężenie NGAL, albuminy, kreatyniny oraz badanie ogólne moczu wykonywano w pierwszej porannej porcji moczu. Na podstawie tych pomiarów wyliczono UACR oraz analogicznie uNGAL/uCr. Stężenie uNGAL oznaczono przy użyciu metody wykorzystującej chemiluminescencję z mikrocząsteczkami CMIA. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano znamienne wyższe wartości stężenia uNGAL/uCr w porannej porcji moczu u chorych z DMt2 i podwyższonym ryzykiem rozwoju CChN w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, nie chorujących na cukrzycę. Zarówno wartości uNGAL/uCr, jak i uNGAL pozostają zależne od płci i zmieniają się proporcjonalnie do czasu trwania oraz stopnia wyrównania cukrzycy. Wyniki badania wykazały, że u 33% chorych, wzrost stężenia NGAL w porannej próbce moczu wyprzedza pojawienie się albuminurii (>30mg/g) uznanej aktualnie za najwcześniejszy marker uszkodzenia nerek. Wykazano również, że wartości stężenia uNGAL/uCr < 21,3 µg/g pozwalają na wczesne przewidywanie uszkodzenia cewek nefronów i korelują z histopatologicznym obrazem biopatów nerek u chorych z DMt2.

Autorka wykazała, że zarówno wzrost wartości UACR powyżej 30mg/g, jak i uNGAL/uCr powyżej 21,3µg/g mogą zostać uznane za czynniki predykcyjne powikłań sercowo-naczyniowych w badanej grupie niezależnie od wieku, płci, czasu trwania cukrzycy, wartości BMI oraz obecności nadciśnienia tętniczego i hiperlipidemii. Analogicznie do zmiennych wykorzystywanych do obliczania wielkości eGFR MDRD, czy eGFR-EPI, przy ocenie stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr należy brać pod uwagę wiek oraz płeć pacjenta. Wyniki pracy nie potwierdzają wpływu blokady RAA oraz leczenia statynami na czynność cewek nerkowych ocenianych wartością wskaźników uNGAL oraz uNGAL/uCr w przebiegu DMt2. Dodatkowo, obecność leukocyturii należy uznać za czynnik ograniczający przydatność zastosowania uNGAL i uNGAL/uCr do oceny ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych w grupie chorych z DMt2. Dla chorych z leukocyturią powinno się ustalić wyższe wartości progowe dla uNGAL oraz uNGAL/uCr.

10. SUMMARY.

A simple, exact and nearly noninvasive indicator of kidney damage, useful in everyday clinical practice is still non-existent. Attempts are made to discover an ideal biomarker – an indicator that is able to detect an early stage of nephropathy, and hence justify the introduction of early treatment preventing further kidney damage, as well as avoiding the renal replacement therapy. The gelatinase-associated lipocalin NGAL is a protein that is easily filtered by the glomerulus and then nearly fully reabsorbed in the proximal tubules. The increased level of NGAL in urine (uNGAL) can be caused either by the damage to the proximal tubule and hence some disorder in the reabsorption, as well as by the increased expression of mRNA in the distal tubule.

The aim of this study is to assess the usefulness of NGAL excreted with urine for the early diagnosis of DKD in the course of DMt2, to find the correlation between the level of uNGAL and the stage of DKD and between the level of diabetes control and the existence of cardio-vascular complications, as well as to assess the correlation between the change in the level of uNGAL and the implementation of treatment influencing the renin angiotensin aldosterone system (RAA) and the lipid management in DMt2 patients. The study group consisted of 55 DM t2 patients aged 18 and over, with the increased risk of DKD. The data obtained were compared against a control group of 22 non-diabetic persons. The measurements of concentration of NGAL, albumin, creatinine and the routine urine analysis were carried out on the first morning urine sample. On the basis of these measurements, the UACR, and then, analogically the uNGAL/uCr, was calculated. The concentration of uNGAL was evaluated by means of the chemiluminescent microparticle immunoassay technique (CMIA). The research has proved that DMt2 patients with a risk of DKD development have a statistically higher concentration of uNGAL/uCr than non-diabetic persons. Additionally, it has been observed that in women suffering from DMt2, the markers of uNGAL/uCr and UACR are higher, which can result from the gender-dependent susceptibility to renal disorders in the course of DMt2. The age turned out to be an independent predictive factor for the concentration of uNGAL and uNGAL/uCr. The level of diabetes control turned out to be an independent predictive factor for the concentration of uNGAL and uNGAL/uCr in DMt2 patients with the risk of DKD. The results of this study showed that in 33% of patients, an increase in concentration of NGAL in a morning urine sample precedes the appearance of albuminuria ($> 30 \text{ mg / g}$) considered at present an early marker of kidney disorder. It was also shown that the concentration of uNGAL / UCR $< 21.3 \text{ } \mu\text{g/g}$ allows early prediction of

nephrons tubular damage and correlate with histopathological image of renal biopsies in patients with DMt2. Furthermore, the high values of UACR ($>30\text{mg/g}$) and uNGAL/uCr ($>321,3\mu\text{g/g}$) markers can be considered as predictive factors for cardiovascular complications in the control group independently of age, gender, DMt2 duration, BMI value, hypertension and hyperlipidemia coexisting. Analogous to the variables used to calculate the values of the MDRD eGFR, or eGFR-EPI, the assessment of the concentration of uNGAL and uNGAL / uCr should take into account the age and sex of the patient. The results of this study suggest that the RAA blockade and statin treatment have no influence on the functioning of kidney tubules assessed by the values of uNGAL and uNGAL/uCr in the course of DMt2. In the presence of leucocyturia, the usefulness of uNGAL and uNGAL/uCr for the cardiovascular complications in the control group is limited. Possibly, for patients with leucocyturia the trough level has to be specified at a higher the value for the markers discussed.

11. PIŚMIENNICTWO

1. Adler A., Stevens R., Manley S. et al.: Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int.* 2003 Jan; 63(1): 225-32.
2. Amann K., Benz K.: Structural renal changes in obesity and diabetes. *Semin. Nephrol.* 2013 Jan; 33(1): 23-33.
3. Apakkan S., Ozmen B., Ozmen D. et al.: Serum and urinary nitric oxide in Type 2 diabetes with or without microalbuminuria: relation to glomerular hyperfiltration. *J. Diabetes Complications.* 2003 Nov-Dec; 17(6): 343-8.
4. Aragon G., Younossi Z.M.: When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. *Cleve Clin. J. Med.* 2010 Mar; 77(3): 195-204.
5. Assal S., Tawfeek S., Rasheed E.A. et al.: Serum Cystatin C and Tubular Urinary Enzymes as Biomarkers of Renal Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin. Med. Insights Endocrinol. Diabetes.* 2013; 6: 7–13.
6. Banu N., Hara H., Okamura M. et al.: Urinary excretion of type IV collagen and laminin in the evaluation of nephropathy in NIDDM: comparison with urinary albumin and markers of tubular dysfunction and/or damage. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1995 Jul; 29(1): 57-67.
7. Barratt J., Topham P.: Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *CMAJ.* 2007 Aug; 177(4): 361–368.
8. Basturk T., Altuntaş Y., Kurklu A. et al.: Urinary N-acetyl B glucosaminidase as an earlier marker of diabetic nephropathy and influence of low-dose perindopril/indapamide combination. *Ren Fail.* 2006; 28(2): 125-8.
9. Bazzi C. , Petrini C., Rizza W. et al.: Urinary N-acetyl- β -glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002; 17(11): 1890-1896.
10. Ben Ameer R., Molina L., Bolvin C. et al.: Proteomic approaches for discovering biomarkers of diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010 Sep; 25(9): 2866-75.
11. Bernard A.M., Vyskocil A.A., Mahieu P. et al.: Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. *Clin. Chem.* 1987 Jun; 33(6): 775-9.
12. Bhensdadia N.M., Hunt K.J., Lopes-Virella M.F. et al.: Urine haptoglobin levels predict early renal functional decline in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2013 Jun; 83(6): 1136-43.

13. Bilous R., Chaturvedi ., Sjolie A.K. et al.: Effect of candesartan on microalbuminuria and albumin excretion rate in diabetes: three randomized trials. *Ann. Intern. Med.* 2009 Jul; 151(1): 11-20.
14. Birk C., Richter K., Huang D.Y. et al.: The salt paradox of the early diabetic kidney is independent of renal innervation. *Kidney Blood Press. Res.* 2003; 26(5-6): 344-50.
15. Bolignano D., Basile G., Parisi P. et al.: Increased plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. *Rejuvenation Res.* 2009 Feb; 12(1): 7-14.
16. Bolignano D., Coppolino G., Romeo A. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in chronic haemodialysis patients. *Nephrology.* 2010 Feb; 15(1): 23-6.
17. Bolignano D., Lacquaniti A., Coppolino G. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009 Feb; 4(2): 337-44.
18. Bolignano D., Lacquaniti A., Coppolino G. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press. Res.* 2009; 32(2): 91-8.
19. Brocco E., Fioretto P., Maurer M. et al.: Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney Int.* 1997 Dec; 63: 40-47
20. Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec; 414(6865): 813-20.
21. Brunner H.I., Mueller M., Rutherford C. et al.: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 2006 Aug; 54(8): 2577-84.
22. Brunskill N.J.: Albumin and proximal tubular cells—beyond endocytosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000 Nov; 15(11): 1732-4.
23. Budhiraja P., Thajudeen B., Popovtzer M.: Absence of albuminuria in type 2 diabetics with classical diabetic nephropathy: Clinical pathological study. *JBiSE.* 2013 May; 6(5A): 20-22
24. Burke J.P., Williams K., Narayan K.M. et al.: A population perspective on diabetes prevention: whom should we target for preventing weight gain? *Diabetes Care.* 2003 Jul; 26(7): 1999-2004.
25. Calabrese V., Mancuso C., Sapienza M. et al.: Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones.* Dec 2007; 12(4): 299–306.
26. Chan J.: Reactive oxygen species promote tubular apoptosis in diabetic nephropathy, *Kidney Week 2013.* Atlanta, GA. 2013 Nov; 7.

27. Chatzigeorgiou A., Lyberi M., Chatzilymperis G. et al. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors*. 2009 Nov-Dec; 35(6): 474-83.
28. Chou K.M., Lee C.C, Chen C.H. et al.: Clinical value of NGAL, L-FABP and albuminuria in predicting GFR decline in type 2 diabetes mellitus patients. *PLOS ONE*. 2013 Jan; 8(1): 54863.
29. Cipollone F., Chiarelli F., Davì G. et al.: A. Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control. *Diabetologia*. 2005 Jun; 48(6): 1216.
30. Clerico A., Galli C., Fortunato A. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012 Feb; 50(9): 1505-17.
31. Cockcroft D.W., Gault M.H.: Prediction of Creatinine Clearance from Serum Creatinine. *Nephron*. 1976; 16: 31–41.
32. Cohen M., Lautenslager G., Shearman C.W.: Increased collagen IV excretion in diabetes. A marker of compromised filtration function. *Diabetes Care*. 2001 May; 24(5): 914-8.
33. Collins A.J., Foley R.N., Herzog Ch. et al.: United States Renal Data System 2012 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease & End-Stage Renal Disease in the United States. *Am. J. Kidney Dis*. 2013; 62(6): 1023-1230.
34. Cooke M., Lunec J., Evans M.: Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free. Radic. Biol. Med.* 2002 Dec; 33(12): 1601-14.
35. Corradi L., Zoppi A., Tettamanti F. et al.: Association between smoking and micro-albuminuria in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Hypertens*. 1993 Dec; 11(5): 190-1.
36. Czekalski S.: Cukrzycowa choroba nerek (nefropatia cukrzycowa) i inne choroby nerek w cukrzycy. Wydawnictwo Termedia, Poznań 2007, wyd. II uzupełnione.
37. Czekalski S.: Nefropatia cukrzycowa. Książek A, Rutkowski B (red.). *Nefrologia*. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2004: 346-371.
38. Dalla Vestra M., Mussap M., Gallina P. et al.: Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2005 Mar; 16(1): 78-82.
39. D'Amico G1, Bazzi C.: Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2003 Nov; 12(6): 639-43.
40. Damsgaard E.M., Froland A., Jorgensen O.D. et al.: Microalbuminuria as predictor of increased mortality in elderly people. *BMJ*. 1990 Feb; 300(6720): 297–300.

41. de Jong P.E., Gansevoort R.T.: Albuminuria in non-primary renal disease: risk marker rather than risk factor. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010 Dec; 25: 656–658.
42. Devarajan P.: Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr. Opin. Pediatr.* 2011 Apr; 23(2): 194-200.
43. Devarajan P.: Emerging biomarkers of acute kidney injury. *Contrib. Nephrol.* 2007; 156: 203-12.
44. Devarajan P.: Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin. Nephrol.* 2007 Nov; 27(6): 637-51.
45. Ding H., He Y., Li K. et al.: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin. Immunol.* 2007 May; 123(2): 227-34.
46. Dwyer J., Lewis J.: Nonproteinuric diabetic nephropathy: when diabetics don't read the textbook. *Med. Clin. North. Am.* 2013 Jan; 97(1): 53-8.
47. Elmarakby A., Sullivan J.: Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc. Ther.* 2012 Feb; 30(1): 49-59.
48. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A. et al.: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 2002 Oct; 23(5): 599-622.
49. Fagerudd J.A., Tarnow L., Jacobsen P. et al.: Predisposition to essential hypertension and development of diabetic nephropathy in IDDM patients. *Diabetes.* 1998 Mar; 47(3): 439-44.
50. Feingold K.R., Grunfeld C., Pang M. et al.: LDL subclass phenotypes and triglyceride metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Arterioscler. Thromb.* 1992 Dec; 12(12): 1496-502.
51. Fioretto P., Steffes M.W., Sutherland D. et al.: Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 69-75.
52. Fioretto P., Mauer M., Brocco E. et al.: Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria. *Diabetologia.* 1996 Dec; 39(12): 1569-76.
53. Flandrois C., Gravagna B., Maire I. et al.: Enzymuria. *Ann. Biol. Clin.* 1986 Feb; 44(5): 486-90.
54. Flower D.R.: Experimentally determined lipocalin structures. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000 Oct; 1482(1-2): 46-56.
55. Forbes J.M., Cooper M.E.: Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.* 2013 Jan; 93(1): 137-88.

56. Forsblad J., Gottsäter A., Persson K. et al.: Clinical manifestations of atherosclerosis in an elderly population are related to plasma neopterin, NGAL and endothelin-1, but not to Chlamydia pneumoniae serology. *Int. Angiol.* 2002 Jun; 21(2): 173-9.
57. Fu W.J., Li B.L., Wang S.B. et al.: Changes of the tubular markers in type 2 diabetes mellitus with glomerular hyperfiltration. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2012 Jan; 95(1): 105-109.
58. Fu W.J., Xiong S., Fang Y. et al.: Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *Endocrine.* 2012 Feb; 41(1): 82-8.
59. Gall M.A., Nielsen F.S., Smidt U.M. et al.: The course of kidney function in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia.* 1993 Oct; 36(10): 1071-8.
60. Giunti S., Tesch G.H., Pinach S. et al.: Monocyte chemoattractant protein-1 has pro-sclerotic effects both in a mouse model of experimental diabetes and in vitro in human mesangial cells. *Diabetologia.* 2008 Jan; 51(1): 198-207.
61. Goligorsky M.S., Chen J., Brodsky S.: Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy : focus on nitric oxide. *Hypertension.* 2001 Feb; 37(2 Pt 2): 744-8.
62. Grigoryev D.N., Liu M., Hassoun H.T. et al.: The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008 Mar; 19(3): 547-58.
63. Grundy S.M., Cleeman J.I., Merz C.N. et al.: Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation.* 2004 Jul; 110(2): 227-39.
64. Haase M., Bellomo R., Haase-Fielitz A.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2008; 241: 89-94.
65. Hall I.E., Yarlagadda S.G., Coca S.G. et al.: IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010 Jan; 21(1): 189-97.
66. Hall J.E., Jones D.W., Kuo J.J. et al.: Impact of the obesity epidemic on hypertension and renal disease. *Curr. Hypertens. Rep.* 2003 Oct; 5(5): 386-92.
67. Hallan S.I., Gansevoort R.T.: Moderator's view: estimating glomerular filtration rate — the past, present and future. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013 Dec; 28(6): 1404–1406.
68. Haller H., Ito S., Izzo J.L. et al.: Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2011; (364): 907-917.
69. Han W., Bailly V., Abichandani R. et al.: Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002 Jul; 62(1): 237-44.

70. Hasegawa M., Ishii J., Kitagawa F. et al.: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *Heart Vessels*. 2013 Dec; 31.
71. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002 Jul; 360(9326): 7-22.
72. Helmersson-Karlqvist J., Larsson A., Carlsson A.C. et al.: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with mortality in a community-based cohort of older Swedish men. *Atherosclerosis*. 2013 Apr; 227(2): 408-13.
73. Hickey F.B., Martin F.: Diabetic kidney disease and immune modulation. *Curr. Opin. Pharmacol*. 2013 Aug; 13(4) :602-12.
74. Hideki I., Hiromichi S., Naohito I. et al.: Enzymuria in Non-Insulin-Dependent Diabetic Patients: Signs of Tubular Cell Dysfunction. *Clin. Sci*. 1993 Apr; 84(4): 469-75.
75. Hinze C.H., Suzuki M., Klein-Gitelman M. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus ery-thematosus disease activity. *Arthritis. Rheum*. 2009 Sep; 60(9): 2772-81.
76. Hirsch R., Dent C., Pfriem H. et al.: NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. *Pediatr. Nephrol*. 2007 Dec; 22(12): 2089-95.
77. Hong C.Y., Chia K.S., Ling S.L.: Urinary protein excretion in Type 2 diabetes with complications. *J. Diabetes Complications*. 2000 Sep-Oct; 14(5): 259-65.
78. Hong C.Y., Chia K.S.: Markers of diabetic nephropathy. *J. Diabetes Complications*. 1998 Jan-Feb; 12(1): 43-60.
79. Hong C.Y., Hughes K., Chia K.S. et al.: Urinary alpha1-microglobulin as a marker of nephropathy in type 2 diabetic Asian subjects in Singapore. *Diabetes Care*. 2003 Feb; 26(2): 338-42.
80. Iijima T., Suzuki S., Sekizuka K. et al.: Follow-up study on urinary type IV collagen in patients with early stage diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal*. 1998; 12(6): 378-82.
81. Ikeda Y., Suehiro T., Takamatsu K. et al.: Effect of smoking on the prevalence of albuminuria in Japanese men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract*. 1997 Apr; 36(1): 57-61.
82. Inker L.A., Levey A.S.: Estimating GFR using the chronic kidney disease epidemiology collaboration (CKD-EPI) 2009 creatinine equation: the time for change is now. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2013; (28): 1390–1396.
83. Inoue M., Oishi C., Shimajiri Y. et al.: Clinical usefulness of measurement of urine type IV collagen for detection of early phase of nephropathy in type 2 diabetic patients. *Rinsho. Byori*. 2008 Jul; 56(7): 564-9.

84. Jerums G., Cooper M., Seeman E. et al.: Spectrum of proteinuria in type I and type II diabetes. *Diabetes Care*. 1987 Jul-Aug; 10(4): 419-27.
85. Jiao L.Y., Guo Q. Song Z. et al.: Diagnostic value of urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin and serum cystatin C on diabetic nephropathy. *Journal of Xinxiang Medical College*. 2011 May.
86. Johnstone D.B., Holzman L.B.: Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2006 May; 2(5): 271-82.
87. Jung K., Burchardt U.: Urinary enzymes in research and in clinical medicine. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1987 Nov; 25(11): 823-8.
88. K/DOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendation for diabetes and chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2007; 49(2): 12–154.
89. Kado S., Aoki A., Wada S. et al.: Urinary type IV collagen as a marker for early diabetic nephropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1996 Mar; 31(1-3): 103-8.
90. Kamijo A., Sugaya T., Hikawa A. et al.: Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am. J. Pathol.* 2004 Oct; 165(4): 1243-55.
91. Kanauchi M., Akai Y., Hashimoto T.: Transferrinuria in type 2 diabetic patients with early nephropathy and tubulointerstitial injury. *Eur. J. Intern. Med.* 2002 May; 13(3): 190-193.
92. Kanauchi M., Nishioka H., Hashimoto T.: Oxidative DNA damage and tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy. *Nephron*. 2002 Jun; 91(2): 327-9.
93. Kaneto H., Katakami N., Kawamori D. et al.: Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 2007 Mar; 9(3): 355-66.
94. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Inter.* 2013 Jan; 3(1).
95. Kępka A. , Waszkiewicz N., Chojnowska S. et al.: Utility of urinary biomarkers in kidney transplant function assessment. *Current Issues and Future Direction in Kidney Transplantation*. February 13, 2013.
96. Khamaisi M., Schrijvers B.F., De Vriese A.S. et al.: The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18(8): 1427-30.
97. Khan S., Cook H.T., Bhargal G. et al.: Antibody blockade of TNF-alpha reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2005 May; 67(5): 1812-20.
98. Kim S.S., Song S.H., Kim I.J. et al.: Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2012 Aug; 97(2): 251-7.

99. Kim S.S., Song S.H., Kim I.J. et al.: Nonalbuminuric proteinuria as a biomarker for tubular damage in early development of nephropathy with type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2014 Mar; 28.
100. Koop K., Eikmans M., Baelde H. et.al.: Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003 Aug; 14(8): 2063-71.
101. Kramer H.J., Nguyen Q.D., Curhan G. et al.: Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2003 Jun; 289(24): 3273-7.
102. Krawczeski C.D., Goldstein S.L., Woo J.G. et al.: Temporal relationship and predictive value of urinary acute kidney injury biomarkers after pediatric cardiopulmonary bypass. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011 Nov; 58(22): 2301-9.
103. Kwon O., Molitoris B., Pescovitz M., et al.: Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *Am. J. Kidney Dis.* 2003 May; 41(5): 1074-87.
104. Leon C.A., Raij L.: Interaction of haemodynamic and metabolic pathways in the genesis of diabetic nephropathy. *J. Hypertens.* 2005 Nov; 23(11): 1931-7.
105. Levey A.S., Bosch J.P., Lewis J.B. et al.: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Intern. Med.* 1999 Mar; 130(6): 461-70.
106. Levey A.S., Stevens L.A. et al.: A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* 2009 May; 150(9): 604-12.
107. Liangos O., Perianayagam M.C., Vaidya V.S. et al.: Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007 Mar; 18(3): 904-12.
108. Lin M., Tang S.C.: Toll-like receptors: sensing and reacting to diabetic injury in the kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2014 Apr; 29(4): 746-54.
109. Lin M., Yiu H.W., Wu H.W.: Toll-Like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012 Jan; (23): 86-102.
110. Ling W., Zhaohui N., Ben H. et al.: Urinary IL-18 and NGAL as early predictive biomarkers in contrast-induced nephropathy after coronary angiography. *Nephrol. Clin. Pract.* 2008; 108(3): c176-81.
111. Lipka D., Boratyński J.: Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2008; (62): 328-336.
112. Lipkin G. W., Yeates C., Howie A. et al.: More than one third of type 2 diabetics with renal disease do not have diabetic nephropathy. A prospective study. *JASN.* 1994; 5(3): 379.

113. Lisowska-Myjak B.: Laboratoryjne wskaźniki ostrego uszkodzenia nerek oznaczane w moczu i w surowicy. *Forum Nefrologiczne*. 2010; 3(2): 71–81.
114. Lisowska-Myjak B.: Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif.* 2010; 29(4): 357-65.
115. Lonnemann G., Koch K.M.: Beta(2)-microglobulin amyloidosis: effects of ultrapure dialysate and type of dialyzer membrane. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002; 13(1): 72-77.
116. Maillard L.C.: Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoïdines par voie méthodique. *Journal de Physiologie*. 1912; 14: 813.
117. Makris K., Rizos D., Kafkas N. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a new biomarker in laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012; 50(9): 1519-32.
118. Malyszko J., Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J.S. et al.: Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in hypertensive and normotensive patients with coronary artery disease. *Nephrology*. 2008 Apr; 13(2): 153-6.
119. Malyszko J., Bachorzewska-Gajewska H., Sitniewska E. et al.: Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in non-diabetic patients with stage 2-4 chronic kidney disease. *Ren. Fail.* 2008; 30(6): 625-8.
120. Malyszko J., Malyszko J.S., Bachorzewska-Gajewska H. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a new and sensitive marker of kidney function in chronic kidney disease patients and renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* 2009 Jan-Feb; 41(1): 158-61.
121. Malyszko J., Malyszko J.S., Kozminski P. et al.: Possible relationship between neutrophil gelatinase-associated lipocalin, hepcidin, and inflammation in haemodialysed patients. *Nephron. Clin. Pract.* 2010; 115(4): c268-75.
122. Marczewski K.T., Dziemidok P., Grzywna R. et al.: Microalbuminuria or micro-alpha-1-microglobulinuria: which one is better predictor of the development of the secondary nephropathy? *Clin. Nephrol.* 1996 Feb; 45(2): 136-7.
123. Matheson A., Willcox M.D., Flanagan J. et al.: Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010 Mar; 26(3): 150-71.
124. McCarthy E., Sharma R., Sharma M. et al.: TNF-alpha increases albumin permeability of isolated rat glomeruli through the generation of superoxide. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998 Mar; 9(3): 433-8.
125. McCormick C.P., Konen J.C., Shihabi Z.K.: Microtransferrinuria and microalbuminuria in the diabetic human. *Clin. Physiol. Biochem.* 1990; 8(2): 53-8.
126. Merchant M.L., Klein J.B.: Proteomic discovery of diabetic nephropathy biomarkers. *Adv. Chronic. Kidney. Dis.* 2010 Nov; 17(6): 480-6.

127. Min W., Yamanaka N.: Three-dimensional analysis of increased vasculature around the glomerular vascular pole in diabetic nephropathy. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 1993; 423(3): 201-7.
128. Mishra J., Dent C., Tarabishi R. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet.* 2005 Apr; 365(9466): 1231-8.
129. Mishra J., Ma Q., Prada A. et al.: Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003 Oct; 14(10): 2534-43.
130. Mishra J., Mori K., Ma Q. et al.: Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004 Dec; 15(12): 3073-82.
131. Mitsnefes M.M., Kathman T.S., Mishra J. et al.: Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2007 Jan; 22(1): 101-8.
132. Mogensen C.E.: Definition of diabetic renal disease in insulin - dependent diabetes mellitus based on renal function tests. Kluwer Academic Publishers. Boston. 1994; 1-14.
133. Moorhead J.F., El-Nahas M., Chan M.K. et al.: Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubule-interstitial disease. *Lancet.* 1982 Dec; 320(8311): 1309 – 1311.
134. Morii T., Fujita H., Narita T. et al.: Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy. *J. Diabetes Complications.* 2003 Jan-Feb; 17(1): 11-5.
135. Moriya T., Moriya R., Yajima Y. et al.: Urinary albumin as an indicator of diabetic nephropathy lesions in Japanese type 2 diabetic patients. *Nephron.* 2002 Jun; 91(2): 292-9.
136. Mumtaz F.H., Dashwood M.R., Khan M.A. et al.: Down-regulation of nitric oxide synthase in the diabetic rabbit kidney: potential relevance to the early pathogenesis of diabetic nephropathy. *Curr. Med. Res. Opin.* 2004 Jan; 20(1): 1-6.
137. Murray P., Chune G.W., Raghavan V.A.: Legacy effects from DCCT and UKPDS: what they mean and implications for future diabetes trials. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2010 Nov; 12(6): 432-9.
138. Myśliwiec M.: Wielka interna. Nefrologia. Medical Tribune Polska, Warszawa 2009: 180-197.

139. Najafian B.: Atubular glomeruli and glomerulotubular junction. Abnormalities in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003 Apr; 14(4): 908-17.
140. Narita T., Hosoba M., Kakei M. et al.: Increased urinary excretions of immunoglobulin G, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2006; 29 (1): 142-144.
141. Narita T., Sasaki H., Hosoba M. et al.: Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2004 May; 27(5): 1176-81.
142. Nath K.A.: Tubulointestinal changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.* 1992 Jul; 20(1): 1–17.
143. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* 2002; 39(1): 1–266.
144. National Kidney Foundation: K/DOQI Clinical Practice Guideline For Diabetes And Chronic Kidney Disease: 2012 UPDATE. *Am. J. Kidney Dis.* 2012; 60(5): 850-886.
145. Navarro J., Mora C., Gómez M. et al.: Influence of renal involvement on peripheral blood mononuclear cell expression behaviour of tumour necrosis factor- α and interleukin-6 in type 2 diabetic patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008 Mar; 23(3): 919-26.
146. Navarro J., Mora C., Muros M. et al.: Urinary tumour necrosis factor- α excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21(12): 3428-3434.
147. Navarro J., Mora-Fernández C.: The role of TNF- α in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Dec; 17(6): 441-50.
148. Nielsen S.E., Reinhard H., Zdunek D. et al.: Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2012 July; 97(1): 71-76.
149. Nielsen S.E., Rossing K., Hess G. et al.: The effect of RAAS blockade on markers of renal tubular damage in diabetic nephropathy: u-NGAL, u-KIM1 and u-LFABP. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2012 Apr; 72(2): 137-42.
150. Nishida M., Kawakatsu H., Okumura Y. et al.: Serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in children with chronic renal diseases. *Pediatr. Int.* 2010 Aug; 52(4): 563-8.
151. Nyengaard J.R., Rasch R.: The impact of experimental diabetes mellitus in rats on glomerular capillary number and sizes. *Diabetologia.* 1993 Mar; 36(3): 189-94.

152. Omerika L., Rasić S., Serdarević N. Importance of determination of urine neutrophile gelatinase associated lipocalin in early detection of acute kidney injury. *Coll. Antropol.* 2014 Mar; 38(1): 161-6.
153. Orlando R.A., Rader K., Authier F. et al.: Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998 Oct; 9(10): 1759-66.
154. Osterby R., Gall M.A., Schmitz A. et al.: Glomerular structure and function in proteinuric type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia.* 1993 Oct; 36(10): 1064-70.
155. Papale M., Di Paolo S., Magistroni R. et al.: Urine proteome analysis may allow noninvasive differential diagnosis of diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2010 Nov; 33(11): 2409-15.
156. Paragas N., Nickolas TL., Wyatt C. et al.: Urinary NGAL marks cystic disease in HIV-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009 Aug; 20(8): 1687–1692.
157. Parikh C.R., Coca S.G., Thiessen-Philbrook H. et al.: Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011 Sep; 22(9): 1748-57
158. Parving H.H. , Persson F, Lewis J.B. et al.: Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 2433-46.
159. Parving H.H., Brenner B.M., McMurray J.J. et al.: Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints (ALTITUDE): rationale and study design. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009 May; 24(5): 1663-71.
160. Pavenstädt H. , Kriz W. , Kretzler M.: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological Reviews.* 2003 Jan; 83: 253-307.
161. Pena M., Lambers Heerspink H.J., Hellemons M.E. et al.: Urine and plasma metabolites predict the development of diabetic nephropathy in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 2014 Sep; 31(9): 1138-47.
162. Pennemans V., Rigo J.M., Faes C. et al.: Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population: are age and gender an issue? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013 Sep; 51(9): 1795-802.
163. Perkowska-Ptasińska A., Bartczak A., Wągrowaska-Danilewicz M. i wsp.: Epidemiologia chorób nerek w Polsce. Przegląd wybranych danych Polskiego Rejestru Nefropatii rozpoznawanych na podstawie biopsji nerek. XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. Lublin 2014.
164. Pettitt D.J., Saad M.F., Bennett P.H. et al.: Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1990 Jul ;33(7): 438-43.

165. Piarulli F., Sartore G., Ceriello A. et al.: Relationship between glyco-oxidation, antioxidant status and microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2009 Jul; 52(7): 1419-25.
166. Portilla D., Dent C., Sugaya T. et al.: Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int*. 2008 Feb; 73(4): 465-72.
167. Prabhakar S., Starnes J., Shi S, Lonis B. et al.: Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2007 Nov; 18(11): 2945-52.
168. Prabhakar S.S.: Pathogenic role of nitric oxide alterations in diabetic nephropathy. *Curr. Diab. Rep*. 2005 Dec; 5(6): 449-54.
169. Prkacin I., Ozvald I., Cavrić G. et al.: Importance of urinary NGAL, serum creatinine standardization and estimated glomerular filtration rate in resistant hypertension. *Coll. Antropol*. 2013 Sep; 37(3): 821-5.
170. Radeke H., Meier B., Topley N. et al.: Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int*. 1990 Feb; 37(2): 767-75.
171. Rashid G., Benchetrit S., Fishman D. et al.: Effect of advanced glycation end-products on gene expression and synthesis of TNF-alpha and endothelial nitric oxide synthase by endothelial cells. *Kidney Int*. 2004 Sep; 66(3): 1099-106.
172. Retnakaran R., Cull C.A., Thorne K. et al.: Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes*. 2006 Jun; 55(6): 1832-9.
173. Ritz E., Keller C., Bergis K.H.: Nephropathy of type II diabetes mellitus. *Nephrol. Dial. Transplant*. 1996; 11(9): 38-44.
174. Rossing K., Mischak H., Dakna M. et al.: Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2008 Jul; 19(7): 1283-90.
175. Rubinstein T., Pitashny M., Levine B. et al.: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel biomarker for disease activity in lupus nephritis. *Rheumatology*. 2010; 49(5): 960-971.
176. Ruggenenti P., Fassi A., Ilieva A.P. et al.: Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med*. 2004; 351(19): 1941-1951.
177. Ruster C., Wolf G.: The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy. *Front. Biosci*. 2008 Jan; 13: 944-55.
178. Rutkowski B., Lichodziejewska-Niemierko M., Grenda R. i wsp.: Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce – 2006. Gdańsk, Wydawnictwo Drukonsul. 2008.

179. Schena .F, Gesualdo L.: Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005 Mar; 16(1): 30-3.
180. Schmitz A., Vaeth M.: Microalbuminuria: a major risk factor in non-insulin-dependent diabetes. A 10-year follow-up study of 503 patients. *Diabet. Med.* 1988 Mar; 5(2): 126-34.
181. Sekizuka K., Tomino Y., Sei C. et al.: Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. *Nephron.* 1994; 68(2): 284-5.
182. Shapiro N.I., Trzeciak S., Hollander J.E. et al.: A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. *Crit. Care. Med.* 2009 Jan; 37(1): 96-104.
183. Sharma K., Karl B., Mathew A. et. al.: Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2013 Nov; 24(11): 1901-12.
184. Sharon D. van Goor R.H., Eddy A.A.: Macrophage diversity in renal injury and repair. *J. Clin. Invest.* 2008 Nov; 118(11): 3522–3530.
185. Shikano M., Sobajima H., Yoshikawa H. et al.: Usefulness of a Highly Sensitive Urinary and Serum IL-6 Assay in Patients with Diabetic Nephropathy. *Nephron.* 2000; 85: 81–85.
186. Sho-ichi Yamagishi, Takanori Matsui.: Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2010 Mar-Apr; 3(2): 101–108.
187. Soler-García A.A., Johnson D., Hathout Y. et al.: Iron-Related Proteins: Candidate Urine Biomarkers in Childhood HIV–Associated Renal Diseases. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009 Apr; 4(4): 763-71.
188. Soprano D.R., Soprano K.J., Goodman D.S.: Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J. Lipid Res.* 1986 Feb; 27(2): 166-71.
189. Sydney C.W., Tang S.C., Loretta Y.Y. et al.: Bradykinin and high glucose promote renal tubular inflammation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010 Mar; 25(3): 698-710.
190. Szurkowska M., Szybiński Z., Nazim A. i wsp.: Chorobowość z powodu cukrzycy typu 2 w populacji Krakowa. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2001; 106: 771-9.
191. Tang S.: It's all about inflammation: the tubulointerstitium in diabetic nephropathy, *Kidney Week 2013 Atlanta. GA.* 2013 Nov; 7.
192. Tang S.C., Chan L.Y., Leung J.C. et al.: Bradykinin and high glucose promote renal tubular inflammation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010 Mar; 25(3): 698-710.
193. Tang S.C., Leung J.C., Chan L.Y. et al.: Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy and the role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006 Jun; 17(6): 1633-43.

194. Tasanarong A., Hutayanon P., Piyayotai D.: Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin predicts the severity of contrast-induced acute kidney injury in chronic kidney disease patients undergoing elective coronary procedures. *BMC Nephrol.* 2013 Dec; 14: 270.
195. Tashiro K., Koyanagi I., Saitoh A. et al.: Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* 2002; 16(1): 1-4.
196. The ADVANCE Collaborative Group: Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2008 Jun; 358(24): 2560-72.
197. Thomson S.C., Vallon V. , Blantz R.C.: Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004 Jan; 286(1): F 8-15.
198. Tomino Y., Suzuki S., Azushima C. et al.: Asian multicenter trials on urinary type IV collagen in patients with diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* 2001; 15(4): 188-92.
199. Trevisan R., Barues D.J., Viberti G.C.: Pathogenesis of diabetic nephropathy. W: Pickup JC, Williams G (red.). *Textbook of diabetes.* Wyd. II. Blackwell Science Ltd., Oxford. 1997; 52.1-53.1.
200. Tsakas S., Goumenos D.: Accurate measurement and clinical significance of urinary transforming growth factor - beta1. *Am. J. Nephrol.* 2006; 26(2): 186-93.
201. Ushiyama T., Suzuki S., Hara M. et al.: Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000 Sep; 15(9): 1379-83.
202. Vaidya V., Ozer J., Dieterle F. et al.: Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol.* 2010 May; 28(5): 478-85.
203. Vallon V., Blantz R.C. Thomson S.: Glomerular hyperfiltration and the salt paradox in early type 1 diabetes mellitus: A tubulo-centric view. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: 530–537.
204. van Timmeren M., van den Heuvel M., Bailly V. et al.: Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J. Pathol.* 2007 Jun; 212(2): 209-17.
205. Vaziri N.D.: Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2004 Jan; 13(1): 93-9.
206. Vedel P., Obel J., Nielsen F.S. et al.: Glomerular hyperfiltration in microalbuminuric NIDDM patients. *Diabetologia.* 1996 Dec; 39(12): 1584-9.
207. Viedt C., Dechend R., Fei J. et al.: MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002 Jun; 13(6): 1534-47.

208. Vlatković V., Stojimirović B., Obrenović R.: Damage of tubule cells in diabetic nephropathy type 2: Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase and γ -glutamyl-transferase. *Vojnosanit. Pregl.* 2007; 64(2): 123-127.
209. von Eynatten M., Baumann M., Heemann U. et al.: Urinary L-FABP and anaemia: distinct roles of urinary markers in type 2 diabetes. *Eur. J. Clin. Invest.* 2010 Feb; 40(2): 95-102.
210. von Eynatten M., Liu D., Hock C. et al.: Urinary adiponectin excretion: a novel marker for vascular damage in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2009 Sep; 58(9): 2093-9.
211. Vriese An. S., Verbeuren T.J. , Van de Voorde J. et al.: Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 2000 Jul; 130 (5): 963–974.
212. Wada T., Furuichi K., Sakai N. et al.: Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2000; 58: 1492-9.
213. Wang G., Lai F., Lai K. et al.: Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron. Clin. Pract.* 2007; 106(4): c169-79.
214. Wasilewska A., Zoch-Zwierz W., Taranta-Janusz K. et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr. Nephrol.* 2010 May; 25(5): 889-97.
215. Westhuyzen J., Endre Z., Reece G. et al.: Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003 Mar; 18(3): 543-51.
216. Widecka K., Grodzicki T., Narkiewicz K. i wsp.: Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym - 2011 rok; Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze.* 2011; 4(15).
217. Więcek A., Chudek J.: Inhibitory konwertazy angiotensyny a przewlekłe choroby nerek. W: A. Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyłło W. (red.) *Inhibitory konwertazy angiotensyny w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego.* Medycyna Praktyczna. Kraków. 2005; 189-201.
218. Wong C., Ho A., Tong P. et al.: Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.* 2007 Jul; 149(1): 123-31.
219. Wong M., Perkovic V., Woodward M. et al.: Circulating bone morphogenetic protein-7 and transforming growth factor- β 1 are better predictors of renal end points in patients with type 2 diabetes mellitus. *Kidney Int.* 2013 Feb; 83(2): 278-84.

220. Wu C., Chen J., Lu K. et al.: Aberrant cytokines/chemokines production correlate with proteinuria in patients with overt diabetic nephropathy. *Clin. Chim. Acta.* 2010 May; 411(9-10): 700-4.
221. Wu J., Ding Y., Zhu C. et al.: Urinary TNF- α and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Exp. Ther. Med.* 2013 Dec; 6(6): 1482–1488.
222. Xu G., Yao Q., Weng Q. et al.: Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004 Sep; 36(1): 101-4.
223. Yagame M., Kim Y., Zhu D. et al.: Differential distribution of type IV collagen chains in patients with diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephron.* 1995; 70(1): 42-8.
224. Yang Y.H., He X.J., Chen S.R. et al.: Changes of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in type-2 diabetic patients with nephropathy: one year observational follow-up study. *Endocrine.* 2009 Aug; 36(1): 45-51.
225. Yoshikawa R., Wada J., Seiki K. et al.: Urinary PGDS levels are associated with vascular injury in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2007 Jun; 76(3): 358-67.
226. Yu H., Yanagisawa Y., Forbes M.S. et al.: Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal tubular function. *J. Clin. Pathol.* 1983 Mar; 36(3): 253–259.
227. Zager R.A., Vijayan A., Johnson A.C.: Proximal tubule haptoglobin gene activation is an integral component of the acute kidney injury "stress response". *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012 Jul; 303(1): 139-48.
228. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2010. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Praktyczna* 2010; 11, supl. A.
229. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Diabetologia Kliniczna* 2014; 3, supl. A.
230. Zandi-Nejad K., Eddy A.A., Glassock R.J. et al.: Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? *Kidney Int.* 2004 Nov; (92): 76-89.
231. Zhang B., Ramesh G., Norbury C. et al.: Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int.* 2007 Jul; 72(1): 37-44.
232. Zografos T., Haliassos A., Korovesis S. et al.: Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 2009 Oct; 7(104): 917-920.

233. Zürbig P., Jerums G., Hovind P. et al.: Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2012 Dec; 61(12): 3304-13.

12. SPIS TABEL

Tabela 1. Prawdopodobieństwo wystąpienia CChN na podstawie oceny nasilenia albuminurii i wartości GFR.....	12
Tabela 2. Przegląd najważniejszych badań dotyczących oznaczania stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr u chorych na DMt2.....	35
Tabela 3. Modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki ryzyka CChN u chorych z DMt2...	37
Tabela 4. Kryteria wyrównania gospodarki węglowodanowej u chorych z DMt2.....	38
Tabela 5. Wartości parametrów lipidowych zalecane u chorych z cukrzycą.....	40
Tabela 6. Badane wskaźniki oceniane w pojedynczej porcji moczu wraz z wartościami referencyjnymi.....	53
Tabela 7. Badane w surowicy parametry biochemiczne, metodologia oznaczeń oraz zakres wartości referencyjnych.....	54
Tabela 8. Zakres wartości referencyjnych wybranych parametrów hematologicznych.....	55
Tabela 9. Dane kliniczne i laboratoryjne dla grupy badanej i kontrolnej.....	57
Tabela 10. Zależności pomiędzy zmianą stężenia uNGAL i uNGAL/uCr oraz wiekiem pacjentów, wielkością BMI, stężeniem kreatyniny w surowicy i moczu oraz eGFR w grupie badanej i kontrolnej.....	61
Tabela 11. Stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr w grupie pacjentów z leukocyturią w porównaniu z pozostałymi pacjentami.....	62
Tabela 12. Zależności między stężeniem uNGAL i wskaźnikiem uNGAL/uCr a stężeniem albuminy w moczu i wskaźnikiem UACR.....	63
Tabela 13. Stężenia uNGAL u pacjentów leczonych preparatami hamującymi układ RAA w porównaniu z pozostałymi pacjentami.....	70
Tabela 14. Zależność między stężeniem uNGAL oraz uNGAL/uCr a stężeniami lipidów w surowicy.....	71

Tabela 15. Modele regresji liniowej wielokrotnej w prognozowaniu zmiany stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr.....	73
Tabela 16. Stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i bez nadciśnienia tętniczego.....	74
Tabela 17. Wskaźnik uNGAL/uCr [$\mu\text{g/g}$] u pacjentów z DMt2 i rozpoznanymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi w porównaniu z pozostałymi pacjentami (z wyłączeniem osób z leukocyturią).....	75
Tabela 18. Stężenia uNGAL [$\mu\text{g/l}$] u pacjentów z DMt2 i rozpoznanymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi w porównaniu z pozostałymi pacjentami (z wyłączeniem osób z leukocyturią).....	76
Tabela 19. Model regresji logistycznej w prognozowaniu powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów z DMt2 (z wyłączeniem osób z leukocyturią).....	79
Tabela 20. Zbiorcze podsumowanie charakterystyki podgrup chorych z DMt2 różniących się wartościami wskaźników uNGAL/uCr i UACR.....	80
Tabela 21. Zależność pomiędzy uszkodzeniami strukturalnymi obserwowanymi w biopsatach nerek chorych na DMt2 wg Brocco i wsp. [19], z wartościami biowskaźników uNGAL/uCr i UACR u chorych z DMt2 w obecnym badaniu.....	89
Tabela 22. Podgrupy chorych różniące się wartościami wskaźników uNGAL/uCr i UACR wraz z proponowaną klasyfikacją uszkodzenia nerek w przebiegu DMt2.....	90

13. SPIS RYCIN.

Rycina 1. Rola poszczególnych wskaźników w patogenezie CChN w przebiegu DMt2.....	20
Rycina 2. Przebieg rekrutacji chorych do grupy badanej.....	45
Rycina 3. Klasyfikacja przewlekłej choroby nerek wg KDIGO.....	49
Rycina 4. Histogram rozkładu wartości uNGAL/uCr w grupie chorych z DMt2 w odniesieniu do wartości 95. percentyla w grupie kontrolnej.....	59
Rycina 5. Wartości wskaźnika uNGAL/uCr u kobiet i mężczyzn w grupie pacjentów chorych na DMt2.....	60
Rycina 6a. Zależność między zmianą stężenia uNGAL i albuminurią w grupie badanej.....	64
Rycina 6b. Zależność między zmianą stężenia uNGAL i albuminurią w grupie kontrolnej...	64
Rycina 7. Zależność między uNGAL/uCr oraz UACR w moczu w grupie badanej.....	65
Rycina 8a. Wartości współczynników uNGAL/uCr oraz UACR u pacjentów z leukocyturią w porównaniu do pozostałych pacjentów.	66
Rycina 8b. Liczba pacjentów z leukocyturią i bez leukocyturii w podgrupach wyróżnionych na podstawie wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR.....	66
Rycina 9a. Wartości współczynników uNGAL/uCr oraz UACR u kobiet w porównaniu z mężczyznami.....	67
Rycina 9b. Liczba kobiet i mężczyzn w podgrupach wyróżnionych na podstawie wartości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR.....	67
Rycina 10a. Czas trwania DMt2 w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr i UACR w grupie badanej.....	68
Rycina 10b. Czas trwania DMt2 w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr i UACR po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią.....	68
Rycina 11. Zależność między stężeniem HbA _{1c} a stężeniem uNGAL w grupie badanej, po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią.....	69

Rycina 12. Liczba pacjentów leczonych preparatami blokującymi układ RAA oraz nie stosujących tych leków w poszczególnych podgrupach wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR.....	70
Rycina 13a. Stężenia triglicerydów w surowicy w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR w całej grupie badanej.....	72
Rycina 13b. Stężenia triglicerydów w surowicy w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią.....	72
Rycina 14. Wartości wskaźnika NGAL/uCr w grupie badanej u pacjentów z powikłaniami sercowo-naczyniowymi i bez takich powikłań (bez chorych z leukocyturią).....	75
Rycina 15a. Liczba chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowymi i bez takich powikłań w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR w całej grupie badanej.....	77
Rycina 15b. Liczba chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowymi i bez takich powikłań w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią.....	77
Rycina 16a. Liczba chorych z chorobą niedokrwinną serca i bez choroby niedokrwiennej serca w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR w całej grupie badanej.....	78
Rycina 16b. Liczba chorych z chorobą niedokrwinną serca i bez choroby niedokrwiennej serca w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią.....	78
Rycina 17a. Liczba chorych z niewydolnością serca i bez niewydolności serca w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR w całej grupie badanej.....	78
Rycina 17b. Liczba chorych z niewydolnością serca i bez niewydolności serca w podgrupach pacjentów wyróżnionych na podstawie wielkości wskaźników uNGAL/uCr oraz UACR po wykluczeniu pacjentów z leukocyturią.....	78