

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Nauk o Zdrowiu

Katarzyna Rybak

*Ocena klinicznego zastosowania wybranych markerów białkowych  
oznaczanych w moczu u chorych z cukrzycową chorobą nerek  
w przebiegu cukrzycy typu drugiego.*

*Praca doktorska*

Opiekun pracy: prof. dr hab. n. med. Marek Kuźniewski

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Nefrologii Uniwersytetu  
Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Marek Kuźniewski

Kraków, 2020 rok

*Panu Profesorowi dr hab. med. Markowi Kuźniewskiemu,*

*Pani Profesor dr hab. med. Beacie Kuśnierz-Cabali,*

*Pani Doktor n. med. Paulinie Dumnickiej*

*z wyrazami wdzięczności.*

# SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW .....	5
2. WSTĘP .....	8
2.1. <i>Przebieg cukrzycowej choroby nerek (CChN)</i> .....	9
2.2. <i>Obraz histopatologiczny CChN w przebiegu T2DM</i> .....	10
2.3. <i>Retinopatia</i> .....	11
2.4. <i>Albuminuria</i> .....	11
2.5. <i>Cystatyna C (CysC)</i> .....	13
2.6. <i>Uromodulina (UMOD)</i> .....	14
2.7. <i>Cząsteczka uszkodzenia nerek-1 (KIM-1)</i> .....	15
2.8. <i>Transferyna (TRF)</i> .....	15
2.9. <i>Lipokalina związana z żelatynazą neutrofili (NGAL)</i> .....	16
2.10. <i><math>\beta</math>2-mikroglobulina (<math>\beta</math>2M)</i> .....	16
2.11. <i>Wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (L-FABP)</i> .....	17
2.12. <i>Rozpuszczalna forma receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPAR)</i> 17	
2.13. <i>Metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9 (MMP-9)</i> .....	18
2.14. <i>Immunoglobulina G (IgG)</i> .....	18
2.15. <i>Elektroforeza białek moczu</i> .....	18
3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....	20
4. MATERIAŁ I METODYKA.....	21
4.1. <i>Materiał</i> .....	21
4.2. <i>Metodyka badań</i> .....	21
4.3. <i>Analiza statystyczna</i> .....	29
5. WYNIKI .....	31
5.1. <i>Charakterystyka grupy badanej</i> .....	31
5.2. <i>Porównanie pacjentów z różnymi wynikami elektroforezy białek moczu</i> .....	36
5.3. <i>Porównanie pacjentów w zależności od obecności uromoduliny w badaniu elektroforezy białek</i> .....	46
5.4. <i>Porównanie pacjentów w zależności od wartości wskaźnika albumina do kreatyniny w pojedynczej porcji moczu (uACR)</i> .....	48
5.5. <i>Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z wartością wskaźnika albumina do kreatyniny w pojedynczej porcji moczu (uACR)</i> .....	52
5.6. <i>Porównanie pacjentów w zależności od wartości eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>)</i> .....	54

5.7.	<i>Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z wartością wskaźnika filtracji kłębuszkowej (eGFR).....</i>	59
5.8.	<i>Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z wybranymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi (wiekiem, czasem trwania cukrzycy, wartością HbA<sub>1c</sub> oraz stężeniami glukozy, CRP i lipidów w surowicy).....</i>	62
5.9.	<i>Wzajemne korelacje między badanymi wskaźnikami uszkodzenia nerek.....</i>	64
5.10.	<i>Ocena związku stosowanego leczenia z wartościami badanych wskaźników uszkodzenia nerek w grupie pacjentów z T2DM .....</i>	65
5.11.	<i>Porównanie pacjentów w zależności od obecności retinopatii i powikłań sercowo-naczyniowych.....</i>	66
6.	<b>OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....</b>	71
6.1.	<i>Podsumowanie wyników .....</i>	71
6.2.	<i>Fenotypy uszkodzenia nerek w cukrzycy.....</i>	72
6.3.	<i>Związek między wielkością albuminurii i rodzajem białkomoczu a stężeniami badanych białek specyficznych.....</i>	75
6.4.	<i>Fenotyp CChN bez zwiększonej albuminurii; związki badanych białek z eGFR ocenianym na podstawie stężeń kreatyniny i cystatyny C w surowicy.....</i>	79
6.5.	<i>Związek badanych białek z istotnymi klinicznymi czynnikami wpływającymi na rozwój CChN .....</i>	85
6.6.	<i>Ograniczenia badania.....</i>	91
7.	<b>WNIOSKI I IMPLIKACJE PRAKTYCZNE .....</b>	93
8.	<b>PIŚMIENNICTWO.....</b>	95
9.	<b>STRESZCZENIE.....</b>	106
10.	<b>ABSTRACT .....</b>	108
11.	<b>SPIS TABEL .....</b>	110
12.	<b>SPIS RYCIN .....</b>	112

# 1. WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Nazwa angielska	Nazwa polska
<b>AKI</b>	acute kidney injury	ostre uszkodzenie nerek
<b>ASA</b>	acetylsalicylic acid	kwas acetylosalicylowy
<b>BMI</b>	body mass index	wskaźnik masy ciała
<b>β2M</b>	β2-microglobulin	β2-mikroglobulina
<b>CChN</b>	-	cukrzycowa choroba nerek
<b>CKD-EPI</b>	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration	-
<b>CRP</b>	C-reactive protein	białko C-reaktywne
<b>CysC</b>	cystatin C	cystatyna C
<b>FSGS</b>	focal segmental glomerulosclerosis	ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych
<b>eGFR</b>	estimated glomerular filtration rate	szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej
<b>eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>)</b>	glomerular filtration rate estimated according to CKD-EPI equation based on serum creatinine	współczynnik filtracji kłębuszkowej oszacowany według wzoru CKD-EPI na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy
<b>eGFR (CKD- EPI<sub>CysC</sub>)</b>	glomerular filtration rate estimated according to CKD-EPI equation based on serum cystatine C	współczynnik filtracji kłębuszkowej oszacowany według wzoru CKD-EPI na podstawie stężenia cystatyny C w surowicy
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	glycated hemoglobin A <sub>1c</sub>	hemoglobina glikowana A <sub>1c</sub>
<b>IgG</b>	immunoglobulin G	immunoglobulina G
<b>IL-6</b>	interleukin 6	interleukina 6
<b>IL-8</b>	interleukin 8	interleukina 8
<b>iPTH</b>	intact parathormone	parathormon (cała cząsteczka)
<b>KDIGO</b>	Kidney Disease: Improving Global Outcomes	-
<b>KIM-1</b>	kidney injury molecule-1	cząsteczka uszkodzenia nerek -1

<b>L-FABP</b>	liver type fatty acid binding protein	wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe
<b>MCH</b>	mean cell haemoglobin	średnia zawartość hemoglobiny w erytrocycie
<b>MCHC</b>	mean cell haemoglobin concentration	średnie stężenie hemoglobiny w erytrocycie
<b>MCV</b>	mean cell volume	średnia objętość erytrocyta
<b>MGN</b>	membranous glomerulonephritis	bloniaste zapalenie kłębuszków nerkowych
<b>MMP-9</b>	matrix metalloproteinase 9	metaloproteinaza 9
<b>MPGN</b>	membranoproliferative glomerulonephritis	bloniasto-rozplemowe zapalenie kłębuszków nerkowych
<b>NGAL</b>	neutrophil gelatinase-associated lipocalin	lipokalina neutrofilowa związana z żelatynazą
<b>NLPZ</b>	-	niesterydowe leki przeciwzapalne
<b>PChN</b>	-	przewlekła choroba nerek
<b>PTD</b>	-	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne
<b>sCr</b>	serum creatinine	kreatynina w surowicy
<b>sCysC</b>	serum cystatine C	cystatyna C w surowicy
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulphate	siarczan dodecyłu sodu
<b>SDS-PAGE</b>	sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis	elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu sodu
<b>sNGAL</b>	serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin	lipokalina neutrofilowa związana z żelatynazą w surowicy
<b>sUMOD</b>	serum uromodulin	uromodulina w surowicy
<b>T2DM</b>	type 2 diabetes mellitus	cukrzyca typu 2
<b>TIA</b>	transient ischaemic attack	przemijający napad niedokrwienny
<b>TRF</b>	transferrin	transferyna
<b>uACR</b>	urine albumin to creatinine ratio	wskaźnik albumina do kreatynina w pojedynczej porcji moczu

<b>uAER</b>	urine albumin excretion rate	dobowe wydalanie albuminy w moczu
<b>uβ2M</b>	urine β2-microglobulin	β2-mikroglobulina w moczu
<b>uCr</b>	urine creatinine	kreatynina w moczu
<b>uIgG</b>	urine immunoglobulin G	immunoglobulina G w moczu
<b>uKIM-1</b>	urine kidney injury molecule-1	cząsteczka uszkodzenia nerek - 1 w moczu
<b>UMOD</b>	uromodulin	uromodulina
<b>uNGAL</b>	urine neutrophil gelatinase- associated lipocalin	lipokalina neutrofilowa związana z żelatynazą w moczu
<b>uL-FABP</b>	urine liver type fatty acid binding protein	wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe w moczu
<b>uTRF</b>	urine transferrin	transferyna w moczu
<b>uUMOD</b>	urine uromodulin	uromodulina w moczu
<b>uPAR</b>	urokinase-type plasminogen activator receptor	receptor urokinazowy aktywatora plazminogenu

## 2. WSTĘP

Cukrzycowa choroba nerek (CChN) to szczególna postać przewlekłej choroby nerek (PChN), z definicji trwająca powyżej 3 miesięcy. W jej przebiegu dochodzi do strukturalnych lub czynnościowych nieprawidłowości w zakresie nerek. Towarzyszy im prawidłowa lub upośledzona filtracja kłębuszkowa. Za CChN w klasycznym ujęciu przemawia obecność białkomoczu lub zwiększonego wydalania albuminy w moczu, jako wyraz glomerulopatii oraz towarzysząca retinopatia [1]. Należy pamiętać, że u chorego na cukrzycę, PChN może mieć również inną etiologię. W przypadku obserwowanego aktywnego osadu moczu, szybkiej utraty funkcji filtracyjnej nerki, znacznego narastania białkomoczu, czyli nieprawidłowości, które sugerują inną etiologię uszkodzenia nerek niż CChN, u chorego z cukrzycą wskazane jest wykonanie biopsji gruboigłowej celem poszerzenia diagnostyki i wyjaśnienia etiologii stwierdzanego uszkodzenia nerki [1].

Na podstawie danych pochodzących z Polskiego Rejestru Biopsji, gromadzonych w latach 2009 – 2014, stwierdzono wzrost odsetka chorych na cukrzycę poddawanych biopsji nerki w Polsce z 10,8% w 2009 do 17,5% w 2014 roku. Zmiany typowe dla CChN stwierdzono u 267 spośród 766 pacjentów z cukrzycą, z czego u 4,6% przypadków współistniały one z uszkodzeniem nerek o innej etiologii. Najczęstszymi chorobami nerek towarzyszącymi cukrzycy były: nefropatia IgA (25,7%), błoniaste zapalenie kłębuszków nerkowych - MGN (14,3%) i błoniasto-rozplemowe zapalenie kłębuszków nerkowych - MPGN (14,3%). Najczęstszymi rozpoznaniem biopsyjnymi u 499 chorych z cukrzycą, u których nie stwierdzono histopatologicznych cech CChN były: ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych - FSGS (17,4%), MGN (11,4%) i nefropatia IgA (10,7%) [2]. Jak pokazują przedstawione powyżej dane, CChN może współistnieć z innym rodzajem uszkodzenia nerek, a stwierdzany białkomocz może być przejawem niecukrzycowej choroby nerek.

CChN zwiększa ryzyko powikłań sercowo - naczyniowych, które jest ok. 37-krotnie większe niż w populacji ogólnej. Wzrasta ono również wraz z zaawansowaniem CChN. U chorego, u którego albuminuria mieści się w granicach pomiędzy 30-300 mg/24h, ryzyko zgonu wynosi ok. 2% rocznie, jeżeli jednak albuminuria wzrasta powyżej 300 mg/24h, to ryzyko zgonu wzrasta do 3,5%. U osób leczonych nerkozastępczo wynosi ono 12% [1]. CChN stanowi także najczęstszą przyczynę schyłkowej niewydolności nerek wymagającej leczenia nerkozastępczego w Polsce.



## 2.1. Przebieg cukrzycowej choroby nerek (CChN)

Przebieg cukrzycowej choroby nerek został opisany na podstawie obserwacji prowadzonych u osób chorujących głównie na cukrzycę typu 1 (T1DM), m.in. z powodu możliwości ustalenia przybliżonej daty zachorowania. Najbardziej rzetelne informacje dotyczące rodzaju uszkodzenia strukturalnego dominującego na danym etapie choroby możemy uzyskać poprzez analizę materiału pobranego w trakcie biopsji gruboigłowej nerki. Było to podstawą opracowania w 2010 roku przez Tevaerta i wsp. [3] klasyfikacji histopatologicznej zmian stwierdzanych w nerkach w przebiegu cukrzycy zarówno typu 1, jak i typu 2 (T2DM).

Pierwszą nieprawidłowością i manifestacją kliniczną, dość wcześnie pojawiającą się w przebiegu CChN jest hiperfiltracja, która wyprzedza cechy strukturalnego uszkodzenia nerki. W dalszym etapie dochodzi do pogrubienia błony podstawnej w obrębie kłębuszków i nagromadzenia macierzy komórkowej w obrębie mezangium. Prowadzi to przerostu kłębuszków oraz powiększenia rozmiaru nerki. Ekspansja mezangium i okluzja kapilar kłębuszka jest przyczyną utraty dostępnej powierzchni filtracyjnej oraz pogorszenia funkcji nerki. Towarzyszy temu zwiększone wydalanie albuminy z moczem [4].

Wzrost wydalania albuminy obserwowany jest najczęściej w drugiej dekadzie od postawienia diagnozy i jest związany także z rozpoczynającą się utratą podocytów. Następnie dochodzi do rozlanego lub ogniskowego stwardnienia kłębuszków nerkowych, któremu towarzyszą zmiany w obrębie naczyń oraz przestrzeni cewkowo - śródmiąższowej. W trakcie jawnej nefropatii stwierdza się obecność stałego białkomoczu oraz spadek filtracji kłębuszkowej. Pomimo tego ściśle zdefiniowanego przebiegu CChN pojawiają się doniesienia, w których u części pacjentów chorujących na T1DM obserwowano pogorszenie funkcji nerek bez znaczącej proteinurii, czy nawet albuminurii [4]. Zagadnienie to w swych badaniach poruszał min. Królewski i wsp. [5]. Podobne doniesienia pojawiały się również w odniesieniu do pacjentów chorujących na T2DM. Przykładem mogą tu być dwa badania, w których brało udział odpowiednio: 301 pacjentów leczonych w przychodni w Australii [6] oraz 1197 Amerykanów (uczestników III Narodowego Badania [7] dotyczącego stanu odżywienia), chorujących na T2DM oraz przewlekłą chorobę nerek (PChN) w stadium G3 – G5. U 39% i 36% badanych wykazano wydalanie albuminy w granicach normy. Podobne wyniki były raportowane w badaniu NEFRON [8] obejmującym 3893 pacjentów z T2DM, na podstawie którego stwierdzono, że nefropatia bez obecnej albuminurii stanowi dominujący rodzaj uszkodzenia nerek w grupie przebadanych pacjentów z PChN w stadium G3.

Interpretując wyniki powyższych badań należy również brać pod uwagę możliwości nakładania się innej choroby na zmiany obserwowane w przebiegu CChN.

## **2.2. Obraz histopatologiczny CChN w przebiegu T2DM**

Klasyfikacja Tervaerta została zakwestionowana z powodu nadmiernego znaczenia przypisywanego w niej uszkodzeniu kłębuszków. Na poparcie tego argumentu, warto przytoczyć badania przeprowadzone przez Dalla Vestra i wsp. [9], którzy badali strukturę nerek we wczesnym stadium CChN u pacjentów z T1DM oraz T2DM. Wykazano min, że cukrzycowa glomerulopatia była bardziej zaawansowana u pacjentów z T1DM i z towarzyszącą jej albuminurią. Grupa pacjentów z T2DM różniła od tych z T1DM, bowiem tylko u 30% chorych z mikroalbuminurią stwierdzono typowe zmiany w obrębie kłębuszków nerkowych, u 40% obserwowano bardziej zaawansowane zmiany cewkowo-śródmiażdżowe i naczyniowe, a u 30% badanych nie wykazano nieprawidłowości w strukturze nerek. Na tej podstawie Fioretto i wsp. [10] zaproponowali odmienny system klasyfikacji zmian obserwowanych w przebiegu CChN u pacjentów z T2DM.

Uszkodzenie struktury nerek w przebiegu CChN może więc przebiegać inaczej niż w T1DM. Trzeba także brać pod uwagę fakt, że T2DM dotyczy osób starszych, obciążonych dodatkowo licznymi schorzeniami, jak miażdżycy czy nadciśnienie tętnicze, a obserwowane u nich zmiany w obrębie kłębuszków, jak i arterioli mogą mieć odmienną patofizjologię. Prawdopodobne jest również, że obserwowana różnorodność zmian strukturalnych stwierdzanych w CChN w przebiegu T2DM stanowi dowód na heterogenną naturę tej choroby.

Fioretto i wsp. [11] wysunęli również wniosek, że rodzaj uszkodzenia struktury nerki decyduje o rokowaniu. U pacjentów ze zmianami typowymi dla CChN obserwuje się szybszy spadek filtracji kłębuszkowej w porównaniu do grupy, w której stwierdzano prawidłowy obraz nerek lub grupy z uszkodzeniem cewkowo-śródmiażdżowymi, czy zmianami w obrębie arterioli. Biorąc pod uwagę spostrzeżenia dokonane przez Gæde i wsp. [12] dotyczące przebiegu CChN u osób z T2DM i mikroalbuminurią, Fioretto i wsp. [11] wysunęli wniosek, że pacjenci z typową glomerulopatią są bardziej predysponowani do rozwinięcia się u nich PChN, a także doświadczają szybszej utraty funkcji filtracyjnej nerki. Natomiast, w grupie chorych, u których dominuje uszkodzenie śródmiaższu, stwierdza się przez cały okres trwania choroby nieznacznie zwiększoną lub prawidłową albuminurię z niewielką utratą funkcji filtracyjnej nerki.

Aktualnie prowadzone są badania mające ustalić rolę podocytów w patogenezie CChN. W grupie 67 chorych na T2DM, wśród których byli pacjenci z podwyższoną albuminurią, jak i jawnym białkomoczem stwierdzono mniejszą liczbę podocytów w kłębuszku oraz zwiększoną szerokość wyrostków stopowatych w porównaniu z pacjentami z prawidłowym wydalaniem albuminy. Wyniki te sugerują, że u chorych na T2DM zmiany strukturalne w obrębie podocytów stwierdzone w mikroskopie elektronowym mogą częściowo wyjaśnić nieprawidłowe wydalanie albuminy u pacjentów, u których w mikroskopie świetlnym nie stwierdza się uszkodzenia kłębuszków. Podocyty prawdopodobnie mają ograniczoną zdolność replikacji. Ich utrata wraz ze wzrostem objętości kłębuszków w przebiegu cukrzycy powoduje, że pozostałe muszą pokryć większy obszar błony podstawnej. Konsekwencją jest powstanie obszarów błony podstawnej bez obecności podocytów, które mogą być potencjalnymi punktami wyjścia dla ogniskowego lub globalnego stwardnienia kłębuszków [13].

### **2.3. Retinopatia**

Obecność retinopatii, która jest kliniczną manifestacją mikroangiopatii, nie jest konieczna do rozpoznania CChN. W T2DM częstość występowania retinopatii jest znacznie mniejsza niż w T1DM. Mniejszy odsetek pacjentów z retinopatią obserwuje się zwłaszcza w postaci CChN, w której stwierdza się prawidłową albuminurię [14]. Przykładem tego jest badanie RIACE [15], w którym uczestniczyło ponad 15 000 pacjentów, wśród których tylko u 175 (10%) z grupy 1673 z PChN oraz prawidłowym wydalaniem albuminy stwierdzono zaawansowaną retinopatię. Natomiast, u 288 osób (22%) wśród 1286 pacjentów z obniżonym GFR oraz zwiększonym wydalaniem albuminy obserwowano zaawansowaną retinopatię. Zaobserwowanie mniejszej częstości występowania retinopatii u pacjentów z PChN i normoalbuminurią może być przesłanką do prób podważenia mikroangiopatii jako podłoża utraty filtracji kłębuszkowej nerki i może sugerować rolę makroangiopatii w patogenezie tego fenotypu choroby. Z kolei, MacIsaac i wsp. [16] na podstawie zaobserwowanych podobnych wskaźników oporu w tętnicach międzypłatowych mierzonych w obrębie nerek za pomocą ultrasonografii dopplerowskiej u osób z PChN, bez względu na wielkość albuminurii postulowali, aby wykluczać rolę miażdżycy naczyń wewnątrznerkowych jako podłoża CChN.

### **2.4. Albuminuria**

Albumina jest białkiem o masie cząsteczkowej 65 kDa, filtrowanym w kłębuszkach nerkowych, a następnie aktywnie wchłanianym zwrotnie w nabłonku sześciennym cewki

proksymalnej nefronu. Oznaczanie wydalania albuminy w moczu pozostaje powszechnie stosowanym bio wskaźnikiem CChN.

Według wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD), oznaczenie albuminy w moczu zaleca się u chorych z T2DM już w momencie rozpoznania choroby [17]. PTD zaleca dodatkowo, aby w celu wykrycia lub oceny stopnia zaawansowania nefropatii wyliczać ilość wydalanej albuminy do kreatyniny w pojedynczej porcji moczu (uACR – urine Albumin/Creatinine Ratio). Wartość tego ilorazu mieszcząca się w zakresie 30-300 mg/g świadczy o zwiększonym wydalaniu albuminy w moczu. Natomiast, jeśli u chorego wskaźnik uACR wynosi >300 mg/g, wówczas stwierdza się jawny białkomocz [1]. U części pacjentów z T2DM, nefropatia może jednak przebiegać bez wyraźnej progresji albuminurii.

Zwiększone wydalanie albuminy uznawane jest za czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych zarówno u osób z cukrzycą, jak i bez cukrzycy. Kluczowym mechanizmem, który przyczynia się do tego procesu może być utrata glikokaliksu – polisacharydowego żelu wyścielającego luminalną powierzchnię śródbłonka, pełniącego funkcję składowej bariery filtracyjnej. Degradacja glikokaliksu w odpowiedzi na aktywację śródbłonka może prowadzić do zwiększonego wydalania albuminy, a następnie do objęcia procesem zapalnym naczyń. Obserwowany wzrost wydalania albuminy jest więc odzwierciedleniem uszkodzenia śródbłonka zarówno w obrębie naczyń nerkowych, jak i układu krążenia [18]. Zwiększenie wydalania albuminy może również towarzyszyć otyłości, zwiększonej aktywności fizycznej, diecie wysokobiałkowej, paleniu tytoniu, okresowi dojrzewania, czy infekcjom [19].

Obecność u chorego podwyższonej albuminurii jest związana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia schyłkowej niewydolności nerek. Zostało to potwierdzone w metaanalizie pięciu badań z udziałem osób z cukrzycą typu 2, w badaniu wykazano względne ryzyko rozwoju PChN G5 równe 3,6 w grupie chorych z podwyższoną albuminurią w porównaniu do grupy z prawidłową albuminurią [20].

U części chorych z cukrzycą oraz podwyższoną albuminurią obserwowano ustąpienie albuminurii. Często, choć nie we wszystkich przypadkach, było to związane z zastosowaniem leków blokujących układ renina – angiotensyna - aldosteron (RAA). Potwierdzają to min. badania Yamada i wsp. [21] oraz Steinke i wsp. [22], w których stwierdzono redukcję albuminurii do wartości prawidłowych u odpowiednio 21% i 64% badanych chorych z T1DM oraz T2DM.

Albuminuria, jako rezultat uogólnionego uszkodzenia naczyń, może też być przejawem innej niż CChN choroby nerek, co należy rozważać na etapie diagnostyki wstępnej u pacjentów, u których nie stwierdza się retinopatii oraz obserwowany jest szybki

spadek eGFR. Rozważania te nasuwają wniosek, że oznaczanie albuminurii pozostaje dobrym narzędziem diagnostycznym, ale albuminuria nie jest patognomicznym objawem u chorych z CChN. Heterogeny obraz uszkodzenia nerek w przebiegu T2DM skłania do poszukiwania nowych, optymalnych wskaźników, które pozwoliłyby przewidzieć prawdopodobieństwo wystąpienia CChN na wczesnym etapie.

## **2.5. Cystatyna C (CysC)**

Cystatyna C jest endogennym inhibitorem proteaz cysteinowych, produkowanym przez wszystkie jądrzaste komórki, w stałej ilości. U osób zdrowych cystatyna C nie podlega sekrecji cewkowej i jest filtrowana przez kłębuszki nerkowe, a następnie całkowicie resorbowana w kanalikach proksymalnych [23]. Cystatyna C jest parametrem oznaczanym głównie w surowicy jako marker filtracji kłębuszkowej, natomiast ocena jej stężenia w moczu może być uznawana za wskaźnik uszkodzenia cewek nerkowych.

Obecnie oznaczenie stężenia cystatyny C dostępne jest w postaci w pełni zautomatyzowanego testu i może być również przeprowadzone w pojedynczych próbkach moczu, ponieważ jej stężenie w moczu nie podlega wahaniom dobowym. Uważa się podanto, że na stężenie cystatyny C, zarówno w moczu, jak i w surowicy nie ma wpływu wiek i masa mięśniowa pacjenta [24]. Cystatyna C nie tworzy też kompleksów z innymi białkami surowicy. Ważnym czynnikiem wpływającym na jej stężenie jest natomiast terapia glikokortykoidami, nieprawidłowości w badaniach hormonalnych tarczycy, ciąża oraz schorzenia wątroby [25]. Okres półtrwania cystatyny C we krwi jest krótszy w porównaniu z kreatyniną, co skutkuje szybszym wzrostem stężenia w surowicy w początkowej fazie ostrego uszkodzenia nerek.

W badaniu przeprowadzonym przez Ravn i wsp. [36] wśród 3077 pacjentów hospitalizowanych w oddziale intensywnej terapii wykazano przewagę oznaczania cystatyny C nad kreatyniną jako czynnika mającego większą wartość prognostyczną zgonu chorego z uszkodzeniem nerek w ciągu roku od zakończenia hospitalizacji. W chwili przyjęcia do oddziału intensywnej terapii u prawie dwa razy większej liczby osób stwierdzano filtrację kłębuszkową  $<60 \text{ ml/min/m}^2$  szacowaną przy użyciu cystatyny C, w porównaniu do filtracji kłębuszkowej szacowanej na podstawie kreatyniny. W oparciu o analizę obejmującą wiek, płeć i współchorobowość stwierdzono, że stężenie cystatyny C nie tylko koreluje ze wzrostem śmiertelności, ale także lepiej sprawdza się w długofalowym monitorowaniu czynności nerek.

Uważa się także, że stężenie cystatyny C oznaczane w surowicy pozostaje bardziej czułym biowskaźnikiem CChN u osób, u których eGFR wynosi  $>60 \text{ ml/min}$ . W badaniu

przeprowadzonym w populacji japońskiej wśród osób chorujących na T2DM wykazano również, że jej oznaczanie ma szczególną wartość diagnostyczną u chorych, u których stwierdzano gorszą funkcję nerek wyrażaną podwyższoną albuminurią [27].

## 2.6. Uromodulina (UMOD)

Uromodulina, znana również jako białko Tamma – Horsfalla (THP), wydzielana jest przez komórki ramienia wstępującego pętli Henlego [28]. Rola biologiczna, jaką odgrywa w organizmie, wciąż nie została jednoznacznie wyjaśniona. W trakcie badań przeprowadzonych na modelach mysich zaobserwowano, że uromodulina w kanalikach nerkowych polimeryzuje w struktury przypominające żel, odgrywające ważną rolę w transporcie jonów, w regulacji aktywności nerkowego kanału potasowego (renal outer medullary potassium channel) i wymiennika sodowo-potasowego-chlorkowego (Na-K-2Cl cotransporter). Z powodu swoich biochemicznych właściwości, uromodulina może uczestniczyć w prewencji zakażeń układu moczowego. W badaniach *in vitro* wykazano, że THP może wybiórczo wiązać się z wypustkami *Escherichia coli* blokując w ten sposób możliwość przyłączenia tej bakterii do receptorów uroplakiny w nabłonku dróg moczowych. Jednak obserwacja ta wymaga dalszych badań z uwagi na fakt, że u pacjentów ze zmniejszonym wydzielaniem uromoduliny nie obserwuje się zwiększenia częstości zakażeń układu moczowego. Stwierdzono również, że mutacja w genie kodującym uromodulinę jest przyczyną wystąpienia autosomalnie dominującej cewkowo - śródmiąższowej choroby nerek. Mutacja prowadzi do powstania zmienionego strukturalnie białka, które gromadzi się w siateczce endoplazmatycznej komórek pętli Henlego stając się przyczyną upośledzenia funkcji zagęszczania moczu, zmniejszenia reabsorpcji sodu w tej części nefronu, co skutkuje zwiększeniem jego reabsorpcji w cewce proksymalnej i związane jest ze zwiększonym wchłanianiem kwasu moczowego. Ponadto, nadmiar nieprawidłowego białka powoduje powstanie stanu zapalnego [29].

W badaniu Pruijm i wsp. [30] przeprowadzonym w dwóch grupach populacji szwajcarskiej postawiono tezę, że uromodulina jest biopskaźnikiem masy cewek. Wykazano także, że ilość wydalanej w ciągu 24 godzin uromoduliny pozytywnie koreluje z wydalaniem elektrolitów i osmolalnością moczu, potwierdzając tym samym, że oceniając wydalanie uromoduliny można równocześnie oceniać funkcję cewek. W pacjentów z T2DM obserwowany jest natomiast spadek sekrecji uromoduliny w moczu. Podobny wniosek wysunęli Troyanov i wsp. [31]. Obserwacja ta dowodzi, że zarówno środowisko cukrzycowe

może być bezpośrednią przyczyną toksyczności w obrębie cewek, a także, że glikozuria może hamować czynność sekrecyjną w ramieniu wstępującym pętli Henlego.

## **2.7. Cząsteczka uszkodzenia nerek-1 (KIM-1)**

Cząsteczka uszkodzenia nerek-1 (*kidney injury molecule 1*; KIM-1) jest markerem uszkodzenia cewek wykorzystywanym w diagnostyce wielu przewlekłych schorzeń nerek. Do ekspresji tej powierzchniowej glikoproteiny dochodzi w części szczytowej cewek [32, 33]. KIM-1 bierze udział w fagocytozie uszkodzonych komórek cewek proksymalnych. Zauważono, że ekspresja KIM-1 wzrasta u pacjentów z cukrzycą w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Stosunkowo słaby, chociaż istotny statystycznie wzrost stężenia KIM-1 w moczu był skorelowany ze wzrostem dobowej albuminurii (*urinary albumin excretion rate*, uAER) [34]. Wzrost sekrecji KIM-1 był również opisywany w okresie hiperfiltracji u pacjentów z T2DM [35]. W przeprowadzonej 3-letniej obserwacji Nielsen i wsp. [34] wykazali, że wysokie wyjściowe stężenie KIM-1 może być związane z szybszym spadkiem eGFR u pacjentów z nefropatią w przebiegu T1DM. Podobne spostrzeżenia dotyczyły badań przeprowadzonych przez Conwaya i wsp. [36] w grupie chorych z T2DM. W badaniu tym, u pacjentów z CChN i eGFR <60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> oraz albuminurią A1 i A3 wg wytycznych Kindey Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) z 2012 r. [37] stwierdzono, że wyliczany wskaźnik KIM-1/kreatynina koreluje ze wskaźnikiem albumina/kreatynina w moczu (uACR). Wyższa wartość wskaźnika była związana z szybszym pogarszaniem się funkcji nerek, a także z większym ryzykiem śmiertelności w badanej grupie chorych. Jednak w analizie wieloczynnikowej korelacja ta nie była istotna statystycznie. Z kolei Nowak i wsp. [38], w oparciu o badania przeprowadzone w populacji chorych z T1DM, zwrócili uwagę na znaczenie oznaczenia stężenia KIM-1 w surowicy, które w bardzo silny sposób korelowało z szybką progresją utraty funkcji filtracyjnej nerek. Niskie wyjściowe stężenie KIM-1 w moczu było silnie związane z regresją albuminurii u chorych z T1DM w ciągu 2 lat badania [40]. Tej obserwacji nie potwierdziły jednak kolejne badania Conwaya i wsp. [41] przeprowadzone w grupie chorych z T2DM.

## **2.8. Transferyna (TRF)**

Transferyna to białko o masie cząsteczkowej zbliżonej do albuminy (76,5 kDa), ale o mniej ujemnym ładunku elektrycznym, co powoduje, że jest znacznie lepiej niż albumina filtrowane do torebki Bowmana [40]. Transferyna podczas uszkodzenia bariery filtracyjnej u chorych z CChN pojawia się w moczu wcześniej i w większych stężeniach niż albumina,

stąd jest uznawana za bardziej czuły wskaźnik uszkodzenia kłębuszka nerkowego. Sekrecja transferyny jest również skorelowana ze stopniem zwłóknienia śródmiąższu oraz atrofią cewek [41]. Zwiększona sekrecja transferyny u osób chorujących na T2DM z prawidłowym wydalaniem albuminy jest czynnikiem prognostycznym pojawienia się zwiększonego wydalania albuminy [42]. Stężenie transferyny w moczu jest znacznie wyższe u chorych, u których stwierdzana jest retinopatia. Zwiększone wydalanie transferyny jest czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby sercowo - naczyniowej, jednak nie ma takiego znaczenia klinicznego jak albuminuria [43]. Transferynuria nie jest specyficzna dla CChN i może pojawiać się w moczu również w innych nefropatiach [44, 45].

## **2.9. Lipokalina związana z żelatynazą neutrofilii (NGAL)**

NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) to glikoproteina należąca do rodziny lipokalin. Białka te odgrywają zasadniczą rolę w wiązaniu i transportowaniu małych hydrofobowych cząsteczek, apoptozie oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej. NGAL jest głównie gromadzony w ziarnistościach neutrofilii, chociaż jego niewielkie ilości produkowane są również w innych tkankach organizmu. Stosunkowo najlepiej poznany jest udział NGAL w ostrym uszkodzeniu nerek (*acute kidney injury*, AKI) [46]. Na uwagę zasługują badania dotyczące oceny zależności między NGAL a otyłością oraz insulinoopornością [47]. Wzrost stężenia NGAL w moczu (uNGAL) stwierdzany jest u pacjentów z T2DM i koreluje dodatnio ze stężeniem cystatyny C oraz kreatyniny w surowicy krwi [46]. W badaniu przeprowadzonym przez Bolignano i wsp. [48] pacjentów z T2DM podzielono na 3 grupy w zależności od wielkości albuminurii. Badacze wykazali podwyższone stężenie NGAL zarówno w moczu, jak i w surowicy u wszystkich pacjentów z cukrzycą, a stężenia NGAL wzrastały wraz z zaawansowaniem nefropatii. Badanie to wykazało także, że wzrost stężenia uNGAL wyprzedza albuminurię [48]. Pojawienie się NGAL w moczu u chorych we wczesnym stadium CChN może być użyteczne diagnostycznie w przewidywaniu uszkodzenia śródmiąższu nerek [49].

## **2.10. $\beta$ 2-mikroglobulina ( $\beta$ 2M)**

$\beta$ 2-mikroglobulina ( $\beta$ 2M) jest białkiem o masie cząsteczkowej 11,8 kDa. Wchodzi w skład cząsteczki głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I, może także występować jako monomer na powierzchni wielu komórek. Białko to jest filtrowane w kłębuszkach nerkowych, a następnie wchłaniane w kanalikule proksymalnym cewek nerkowych przy udziale megaliny [50]. We wszystkich przeprowadzonych dotychczas



badaniach stwierdzono, że osoby starsze mają wyższe stężenie  $\beta$ 2-mikroglobuliny w surowicy. Na wzrost stężenia  $\beta$ 2M w surowicy mają również wpływ choroby współistniejące: nowotwory, choroby limfoproliferacyjne (szpiczak i przewlekła białaczka limfoblastyczna) oraz wiele chorób autoimmunologicznych.  $\beta$ 2-mikroglobulina uznawana jest za ważny endogeny marker filtracji kłębkowej, a wzrost jej stężenia w surowicy w przebiegu uszkodzenia nerki wyprzedza wzrost stężenia kreatyniny. W badaniu Mise i wsp. [51] oceniano wartość prognostyczną oznaczenia  $\beta$ 2-mikroglobuliny w moczu oraz histopatologicznej oceny stopnia zwłóknienia śródmiąszu w przebiegu CChN u chorych z T2DM. U 89% badanych wykazano jawny białkomocz, a stężenie  $\beta$ 2-mikroglobuliny w moczu korelowało znacząco ze stopniem uszkodzenia śródmiąszu. Jednocześnie potwierdzono, że histologiczna ocena ma większą wartość predykcyjną rozwoju schyłkowej niewydolności nerek. Zaobserwowano, że u chorych T2DM wraz ze wzrostem stężenia  $\beta$ 2M w moczu zwiększa się częstość występowania powikłań naczyniowych [52].

### **2.11. Wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (L-FABP)**

Wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (*liver type fatty acid-binding protein*, L-FABP) jest białkiem o masie cząsteczkowej 14 kDa, które ulega ekspresji w hepatocytach, a także w cewce nerkowej pod wpływem stresu oksydacyjnego oraz niedokrwienia [53]. Dotychczasowe badania wykazały, że stężenie L-FABP w moczu pacjentów z cukrzycą typu 2 może być podwyższone już na wczesnym etapie rozwoju CChN [54]. Kamijo-Ikemori i wsp. [55] wykazali, że wysokie wyjściowe stężenie L-FABP w moczu było czynnikiem prognostycznym postępu CChN u 104 pacjentów z T2DM w czasie 4-letniego okresu obserwacji. Araki i wsp. [56] wysunęli podobne wnioski na podstawie trwającego 12 lat badania, w którym brało udział 618 pacjentów z T2DM bez jawnej nefropatii na początku obserwacji. Z tego powodu stężenie L-FABP w moczu jest obecnie uznawane za wczesny czynnik predykcyjny progresji CChN.

### **2.12. Rozpuszczalna forma receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPAR)**

Rozpuszczalna forma receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu (*urokinase-type plasminogen activator receptor*, uPAR) powstaje w wyniku odszczepienia zewnątrzkomórkowego fragmentu receptora błonowego, który występuje na komórkach układu immunologicznego (makrofagów i neutrofilii) [57]. uPAR odgrywa istotną rolę w procesach odpornościowych, między innymi poprzez udział w migracji komórek układu

odpornościowego, czy indukcję chemotaksji i proteolizy [58]. Podwyższone stężenia uPAR w surowicy stwierdza się w przebiegu chorób autoimmunologicznych i niektórych nowotworów. Obserwowano także wzrost stężenia uPAR w przebiegu infekcji wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych [59]. W badaniu Guthoff i wsp. [60] stwierdzono, że wyższe stężenie uPAR w surowicy u chorych ze stanem przedcukrzycowym sprzyja wystąpieniu zwiększonego wydalania albuminy, a u pacjentów z rozpoznaną T2DM koreluje z wielkością albuminurii.

### **2.13. Metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9 (MMP-9)**

Metaloproteinazy należą do grupy endopeptydaz, a do ich zadań należy trawienie białkowych składników przestrzeni zewnątrzkomórkowej, hydroliza substancji uwalnianych przez błony, takich jak czynniki wzrostu i chemokiny [61]. Do wzrostu stężenia metaloproteinaz dochodzi także w chorobach nowotworowych, schorzeniach degeneracyjnych tkanki nerwowej i posocznicy. W badaniu Szu-Yuan Li i wsp. [62], u myszy z cukrzycą wyindukowaną streptozotocyną, po 6 miesiącach obserwacji stwierdzono zwiększone wytwarzanie i aktywność MMP-9 w kłębuszkach nerkowych.

### **2.14. Immunoglobulina G (IgG)**

Immunoglobulina G jest białkiem o dużej masie cząsteczkowej (150 kDa) i stanowi ok. 5-10% białka całkowitego w moczu fizjologicznym. Szereg badań, w tym badanie Yashima i wsp. [63] przeprowadzone wśród 197 chorych z T2DM wykazało, że wydalanie IgG z moczem było znacznie zwiększone w tej grupie chorych w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. Ponadto obserwowano, że wzrost wydalania IgG z moczem korelował z nasileniem zmian histologicznych w nerkach. Takiej zależności nie stwierdzano natomiast w przypadku albuminurii.

### **2.15. Elektroforeza białek moczu**

Analiza wybranych białek specyficznych, prognostycznych dla CChN, zarówno tych dobrze poznanych i uznanych za patognomiczne, jak i nowo rozpoznawanych wskaźników, nie daje w pełni obrazu zmian patologicznych rozwijających się w nerkach. Procedura diagnostyczna sugerująca oznaczanie szerokiego profilu białek specyficznych jest kosztowna i przez to rzadko znajduje zastosowanie w praktyce klinicznej. Z punktu widzenia metodologii badań, pomiar wielu z proponowanych białek specyficznych, w tym cystatyny C w surowicy,  $\beta$ 2-mikroglobuliny, transferyny i IgG w moczu, jest dostępny jedynie

w wybranych, wyspecjalizowanych laboratoriach diagnostycznych. Ciągłe trwa więc poszukiwanie optymalnych biowskaźników, które w sposób kompleksowy pozwoliłyby na ocenę miejsca uszkodzenia nerki poddanej hiperglikemicznemu środowisku i pozostawały dostępne, tanie oraz możliwe do oznaczania w porannej porcji moczu. Jednym z badań pozwalających na kompleksową ocenę rodzaju uszkodzeń zachodzących w nerkach w przebiegu CChN jest analiza białek moczu oparta na rozdziale elektroforetycznym. Elektroforeza białek moczu jest dobrze poznanym i uznanym klinicznie badaniem stosowanym w diagnostyce od wielu lat. Jednak w świadomości wielu nefrologów wykorzystanie tego badania ograniczane bywa do diagnostyki „nerki szpiczakowej” i gammopatii monoklonalnych. Elektroforeza białek z użyciem siarczanu dodecyłu sodu na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) pozwala ocenić masę cząsteczkową białek. Na podstawie tej metody białka wydalane z moczem można podzielić na białka o wysokiej masie cząsteczkowej tj. powyżej 100 kD (*high molecular weight proteins*, HMWP), białka o pośredniej masie cząsteczkowej (*medium molecular weight proteins*, MMWP) oraz białka o małej masie cząsteczkowej (*low molecular weight proteins*, LMWP) [64]. Dotychczas przeprowadzono niewiele badań z zastosowaniem elektroforezy białek surowicy u chorych ze schorzeniami nefrologicznymi. Woo i wsp. [65] w swojej pracy wykazali, że obecność białek niskocząsteczkowych oceniana metodą SDS-PAGE u chorych z nefropatią IgA w trakcie 6-letniej obserwacji w istotnym stopniu wiąże się z częstszym występowaniem pogorszenia funkcji nerek. Z kolei Bazzi i wsp. [66] przebadali 145 pacjentów z białkomoczem w przebiegu różnych pierwotnych glomerulopatii: z ogniskowym segmentowym stwardnieniem kłębuszków nerkowych (*focal segmental glomerulosclerosis*, FSGS), nefropatią błoniastą i błoniasto-rozplemowym kłębuszkowym zapaleniem nerek. U tych chorych, u których stwierdzono obecność w moczu białek drobnocząsteczkowych (<20 kDa), wykazano również wyższe stężenie kreatyniny, większy białkomocz, większy stopień destrukcji śródmiąższu oraz gorszą odpowiedź na leczenie immunosupresyjne.

Elektroforeza białek moczu nie była dotychczas rutynowo stosowana do oceny białkomoczu u chorych z T2DM. Tymczasem heterogeny fenotyp CChN w przebiegu T2DM pozwala przypuszczać, że w tej grupie pacjentów profil wydalanych białek w moczu może być różny, a różnice te mogą mieć istotne przełożenie na rozkład elektroforetyczny białek moczu.

### 3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Celem badania była analiza użyteczności diagnostycznej oznaczania wybranych białek w surowicy i moczu oraz badania elektroforezy SDS-PAGE białek moczu w diagnostyce CChN u chorych z T2DM. W szczególności przeprowadzono ocenę:

1. korelacji uzyskanych wyników badania elektroforezy białek moczu z uznanymi parametrami wykorzystywanymi do oceny uszkodzenia nerek, tj.: stężenie kreatyniny i cystatyny C w surowicy oraz wyliczony na ich podstawie wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR), albuminuria, wskaźnik uACR, stężenie NGAL w moczu (uNGAL) i wskaźnik uNGAL/uCr;
2. związku wyników elektroforezy białek moczu z obecnością powikłań makro- i mikroangiopatycznych u chorych z CChN w przebiegu T2DM;
3. zależności składu białek moczu w grupie chorych z CChN od: wieku, płci, czasu trwania T2DM, stopnia wyrównania cukrzycy (HbA<sub>1c</sub>), oraz obecności zaburzeń metabolicznych (lipidogram, kwas moczowy) i zmian zapalnych (białko C-reaktywne);
4. przydatności diagnostycznej oceny stężeń uromoduliny w surowicy i w moczu oraz KIM-1 i L-FABP w moczu u chorych w różnym stadium zaawansowania CChN w przebiegu T2DM;
5. przydatności diagnostycznej oznaczeń transferyny, IgG i  $\beta$ 2-mikroglobuliny w moczu chorych z CChN z T2DM.

## **4. MATERIAŁ I METODYKA**

### **4.1. Materiał**

Projekt pracy był realizowany we współpracy pomiędzy Katedrą i Kliniką Nefrologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie oraz Kliniką Nefrologii Wojewódzkim nr 2 im. Św. Jadwigi w Rzeszowie.

Do badania zakwalifikowano łącznie 117 pacjentów z rozpoznaną T2DM rekrutowanych spośród osób zgłaszających się do leczenia w Poradni Nefrologicznej Szpitala Wojewódzkiego nr 2 im. Królowej Jadwigi w Rzeszowie w okresie 12 miesięcy. Do badania włączono jedynie dorosłych chorych w wieku powyżej 18 lat spełniających następujące kryteria: z rozpoznaniem T2DM, szacowaną filtracją kłębuszkową eGFR >30 ml/min/1,73m<sup>2</sup> oraz uACR <300 mg/g.

Do badania nie zakwalifikowano chorych, którzy nie wyrazili świadomej zgody na udział w badaniu potwierdzonej własnoręcznym podpisem, a także chorych z niestabilnym ciśnieniem tętniczym, stosujących w bieżącym leczeniu leki potencjalnie nefrotoksyczne, z obecnością lub podejrzeniem innej niż CChN przyczyny choroby nerek, objawami zakażenia dróg moczowych lub zakażeń ogólnoustrojowych, chorobą nowotworową, udokumentowaną w wywiadzie alergią oraz chorobą układową tkanki łącznej.

Badanie posiadało wymaganą zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie (nr 16/2016/B).

### **4.2. Metodyka badań**

#### **4.2.1. Charakterystyka ogólna grupy badanej**

Pierwszym etapem badania było zebranie dokładnego wywiadu lekarskiego, ze szczególnym uwzględnieniem czasu trwania cukrzycy, a także chorób i objawów chorobowych współistniejących, które mogłyby stanowić powód wykluczenia chorego z prowadzonego badania. Każdy pacjent spełniający kryteria włączenia był szczegółowo informowany o celu prowadzonego badania i w przypadku chęci uczestnictwa podpisywał własnoręcznie świadomą zgodę na udział w badaniu.

#### **4.2.2. Ocena parametrów klinicznych**

##### **4.2.2.1. Wskaźnik masy ciała (BMI)**

Wielkość wskaźnika masy ciała wyliczano w oparciu o wzór Queteleta:

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

#### 4.2.2.2. Wskaźnik filtracji kłębuszkowej eGFR wg wzorów CKD-EPI

Wartość eGFR na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy wyliczano w oparciu o równanie Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) z 2009 r. [37]:

$$GFR (CKD-EPI_{Cr}) = 141 \times \min(sCr/\kappa, 1)^\alpha \times \max(sCr/\kappa, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{wiek}}$$

[x 1,018 dla kobiet] [x 1,159 dla rasy czarnej]

gdzie:

$sCr$  = stężenie kreatyniny w surowicy w mg/dl

$\kappa = 0.7$  w przypadku kobiet

$\kappa = 0.9$  w przypadku mężczyzn

$\alpha = -0.329$  w przypadku kobiet

$\alpha = -0.411$  w przypadku mężczyzn

*min* – minimum ( $sCr/\kappa$  lub 1)

*max* – maksimum ( $sCr/\kappa$  lub 1)

Wielkość eGFR na podstawie stężeń cystatyny C w surowicy krwi wyliczano w oparciu o wzór CKD-EPI<sub>CysC</sub> z 2012 r. [73]:

$$GFR (CKD-EPI_{CysC}) = 133 \times \min(sCysC/0,8; 1)^{-0,499} \times \max(sCysC/0,8; 1)^{-1,328} \times 0,996^{\text{Wiek}}$$

[x 0,932 dla kobiet]

gdzie:

$sCysC$  = stężenie cystatyny C w surowicy w mg/l

*min* – minimum ( $sCysC/0,8$  lub 1)

*max* – maksimum ( $sCysC/0,8$  lub 1)

#### 4.2.2.3. Wskaźnik albumina/kreatynina w pojedynczej porcji moczu

Na podstawie pomiarów stężenia albuminy i kreatyniny przeprowadzonych w pojedynczej porcji moczu wyliczono wskaźnik uACR ze wzoru:

$$uACR (mg/g) = \text{albumina (mg/l)} / \text{kreatynina (g/l)}.$$

#### 4.2.2.4. Wskaźnik uNGAL/kreatynina w pojedynczej porcji moczu

Na podstawie pomiarów stężenia NGAL i kreatyniny przeprowadzonych w pojedynczej porcji moczu wyliczono wskaźnik uNGAL/uCr:

$$uNGAL/uCr (\mu g/g) = NGAL (\mu g/l) / kreatynina (g/l).$$

#### **4.2.2.5. Wskaźnik uUMOD/kreatynina w pojedynczej porcji moczu**

Na podstawie pomiarów stężenia uromoduliny i kreatyniny przeprowadzonych w pojedynczej porcji moczu wyliczono wskaźnik uUMOD/uCr:

$$uUMOD/uCr \text{ (mg/g)} = UMOD \text{ (mg/l)} / \text{kreatynina (g/l)}.$$

#### **4.2.2.6. Wskaźnik uKIM-1/kreatynina w pojedynczej porcji moczu**

Na podstawie pomiarów stężenia KIM-1 i kreatyniny przeprowadzonych w pojedynczej porcji moczu wyliczono wskaźnik uKIM/uCr:

$$uKIM-1/uCr \text{ (}\mu\text{g/g)} = KIM-1 \text{ (}\mu\text{g/l)} / \text{kreatynina (g/l)}.$$

#### **4.2.2.7. Wskaźnik uL-FABP/kreatynina w pojedynczej porcji moczu**

Na podstawie pomiarów stężenia L-FABP i kreatyniny przeprowadzonych w pojedynczej porcji moczu wyliczono wskaźnik uL-FABP/uCr:

$$uL-FABP/uCr \text{ (}\mu\text{g/g)} = L-FABP \text{ (}\mu\text{g/l)} / \text{kreatynina (g/l)}.$$

### **4.2.3. Analiza wyników badań laboratoryjnych**

Podstawowe badania laboratoryjne wraz z morfologią krwi obwodowej oraz badaniem ogólnym moczu przeprowadzono w Laboratorium Diagnostycznym Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 im. Królowej Jadwigi w Rzeszowie. Badania białek specyficznych tj. cystatyny C w surowicy oraz transferyny i IgG w moczu wykonano w Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Badanie rozdziału elektroforetycznego białek w moczu metodą SDS-PAGE przeprowadzono w Zakładzie Diagnostyki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, natomiast pomiar stężenia uromoduliny w surowicy i w moczu, uPAR i MMP-9 w surowicy oraz L-FABP i KIM-1 w moczu wykonano w Zakładzie Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

#### **4.2.3.1. Metody pozyskiwania i przechowywania materiału do badania**

Materiałem do badań laboratoryjnych była próbka krwi pobierana na czczo poprzez nakłucie żył przedramienia do systemów próżniowych firmy Sarstead (Nümbrecht, Niemcy). Do badania morfologii krwi pobierano krew do probówek zawierających dodatkowy

antykoagulant (K<sub>2</sub>EDTA), natomiast do badania biochemicznego pobierano krew „na skrzep” do próbek bez dodatkowych antykoagulantów.

W przypadku krwi pobranej do badań biochemicznych, po 30 minutach od pobrania i wytworzeniu się skrzepu, krew wirowano z prędkością 4000 obrotów/min. przez 10 minut. Uzyskaną w ten sposób surowicę oddzielano od elementów morfotycznych i wykorzystywano do badań rutynowych. Po wykonaniu badania morfologii krwi, próbkę również wirowano w tych samych warunkach, a uzyskane osocze porcjowano w probówkach o objętości 300-500µL. Po rozporcjowaniu, próbki surowicy, osocza oraz moczu, zamrażano w temp. -80°C i przechowywano do czasu zebrania pełnego kompletu próbek. Oznaczenia w materiale zabezpieczonym przeprowadzono w seriach. Zestawy do oznaczeń wybranych markerów posiadały próbki kontrolne zapewniające przeprowadzenie procedury oznaczeń zgodnie z zasadami medycyny laboratoryjnej opartej o dowody naukowe (*Evidence-based Laboratory Medicine*).

#### **4.2.3.2. Metodyka badań laboratoryjnych**

##### **4.2.3.2.1. Parametry oznaczane w moczu**

Badanie ogólne moczu wykonywano w porannej porcji moczu przy użyciu analizatora Labumat-Urised 2 (77 Elektronika, Budapeszt, Węgry). Stężenie uNGAL w pierwszej porannej porcji moczu oznaczano z wykorzystaniem metody chemiluminescencji z mikrocząsteczkami CMIA na analizatorze Architect (Abbott Diagnostics, Abbott Park, USA). Stężenie albuminy oznaczano przy użyciu techniki immunoturbidymetrycznej, natomiast kreatyniny z wykorzystaniem metody enzymatycznej na analizatorze biochemicznym Olympus/Beckman Coulter Analyzer AU680 (Beckman Coulter, Brea, USA).

Pomiar wybranych białek specyficznych tj. transferyny, β<sub>2</sub>-mikroglobuliny oraz IgG w moczu przeprowadzono z wykorzystaniem metody immunonefelometrycznej na analizatorze Nephelometer BN II (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Niemcy).

Do oznaczania stężeń wybranych markerów użyto komercyjnie dostępnych testów immunoenzymatycznych: uromodulinę oznaczono za pomocą zestawu Human Uromodulin ELISA (BioVendor, Brno, Czechy), L-FABP za pomocą zestawu High Sensitivity Human L-FABP ELISA TMB (CMIC Holding Co., Tokyo, Japonia), uPAR za pomocą zestawu Quantikine Human uPAR ELISA, zaś KIM-1 przy pomocy zestawu Quantikine Human TIM/KIM-1/HAVCR Immunoassay ELISA (R&D Systems, McKinley Place, MN, USA).



Pomiary przeprowadzone zostały przy użyciu automatycznego czytnika płytek Automatic Micro ELISA Reader ELX 808 (BIOTEK®Instruments, Inc. Winooski, VT, USA).

W Tabeli 1 zamieszczono zakres wartości referencyjnych dla badanych wskaźników ocenianych w pojedynczej porcji moczu.

**Tabela 1.**

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

Parametr badany	Jednostka	Wartości referencyjne
uNGAL	µg/l	10,9 (6,0-38,2)*
uNGAL/uCr	µg/g	12,2 (5,9-27,9)*
Albumina	mg/l	<20,0
Kreatynina	mmol/l	kobiety: 2,5 -19,0; mężczyźni: 3,5-23,0
uACR	mg/g	<30
uUMOD	µg/ml	średnia: 11,17**; mediana: 3,63**
uUMOD/uCr	µg/g	brak danych
uKIM-1	µg/l	0,156-5,33**
uKIM-1/uCr	µg/g	0,225-3,20**
uL-FABP	µg/l	brak danych
uL-FABP/uCr	µg/g	brak danych
uTRF	mg/l	<2,17
uIgG	mg/l	<3,36
uβ2M	mg/l	<0,22

\*w oparciu o wyniki własne zespołu badawczego; \*\*w oparciu o wartości podane przez producenta zestawu

Rozdział elektroforetyczny białek moczu metodą SDS-PAGE przeprowadzono w warunkach nieredukujących, z użyciem żeli poliakrylamidowych (12,5% akrylamidu), w systemie elektroforezy pionowej Mini-Protean (Bio-Rad, CA, USA). Białka wybawiono za pomocą barwnika Coomassie brilliant blue G250 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). Żele zeskanowano. Rozdziały elektroforetyczne oceniono jakościowo, klasyfikując każdy rozdział do jednej z pięciu kategorii: obecność białka w elektroforezie niewykrywalna

(brak białka, BB), obecność śladowej ilości albuminy bez widocznych innych białek (A), obecność wyraźnego prążka albuminy bez widocznych innych białek (obraz odpowiadający białkomoczowi kłębuszkowemu selektywnemu, KS), obecność wyraźnego prążka albuminy z towarzyszącymi prążkami białek o masie cząsteczkowej większej niż albumina (obraz odpowiadający białkomoczowi kłębuszkowemu nieselektywnemu, KNS), jednoczesna obecność albuminy, białek wielkocząsteczkowych i drobnocząsteczkowych (obraz odpowiadający białkomoczowi mieszanemu kłębuszkowo-cewkowemu, MKC). Nie obserwowano rozdziałów odpowiadających „czystemu” białkomoczowi cewkowemu. Osobno oceniono obecność prążka uromoduliny (białka Tamma-Horsfalla) w rozdziale, klasyfikując każdy rozdział do kategorii THP (prążek uromoduliny obecny) lub BTHP (prążek uromoduliny nieobecny). Położenie prążka uromoduliny potwierdzono uprzednio metoda western blot. Klasyfikację rozdziałów elektroforetycznych przeprowadzono bez znajomości wyników innych badań laboratoryjnych i danych klinicznych chorych.

#### **4.3.3.2.2. Badanie morfologii krwi obwodowej**

Badanie morfologii krwi przeprowadzono w próbkach krwi pobranych na wersenian dwupotasowy ( $K_2EDTA$ ) z wykorzystaniem automatycznego analizatora hematologicznego typu 5 diff ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Niemcy). Zakres wartości referencyjnych ocenianych parametrów morfologii krwi przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2.**

Zakres wartości referencyjnych dla parametrów morfologii krwi obwodowej.

Parametr badany	Jednostka	Zakres wartości referencyjnych
Leukocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$	4,0 – 10,0
Neutrofile	$\times 10^3/\mu\text{l}$ (%)	2,4 – 7,0 (58,0 – 66,0)
Limfocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$ (%)	1,0 – 5,0 (20,0 - 45,0)
Monocyty	$\times 10^3/\mu\text{l}$ (%)	0,16 - 0,8 (4,0 – 8,0)
Eozynofile	$\times 10^3/\mu\text{l}$ (%)	0,04 – 0,3 (1,0 – 4,0)
Bazofile	$\times 10^3/\mu\text{l}$ (%)	0,0 – 0,1 (0 – 1,0)
Erytrocyty	$\times 10^6/\mu\text{l}$	kobiety: 3,5 – 5,5; mężczyźni: 4,5 – 6,5
Hemoglobina	g/dl	kobiety: 11,0 – 15,0; mężczyźni: 12,0 – 17,0
Hematokryt	%	kobiety: 37,0 – 47,0; mężczyźni: 40,0 – 54,0
MCV	fl	82,0 – 92,0
MCH	pg	27,0 – 31,0
MCHC	g/dl	32,0 -36,0
Płytki krwi	$\times 10^3/\mu\text{l}$	150,0 – 350,0

#### 4.3.3.2.3. Badania biochemiczne i immunochemiczne

Badania parametrów biochemicznych oraz enzymatycznych oznaczano w surowicy krwi chorych z wykorzystaniem zautomatyzowanej platformy analitycznej na analizatorze biochemicznym Olympus AU680 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Zakres wartości referencyjnych wraz z metodyką zamieszczono w Tabeli 3.

Ocenę stopnia wyrównania glikemii prowadzono w oparciu o pomiar HbA<sub>1c</sub> z wykorzystaniem metody immunochromatograficznej (HPLC). Przyjęte przedziały referencyjne wynosiły 4-6 % dla zdrowych i >6,5% dla chorych z cukrzycą.

**Tabela 3.**

Zakres wartości referencyjnych dla parametrów biochemicznych i immunochemicznych.

<b>Parametr badany (jednostka)</b>	<b>Metoda pomiaru</b>	<b>Zakres wartości referencyjnych</b>
Glukoza (mmol/l)	metoda z heksokinazą	3,3 – 5,1
Kreatynina (μmol/l)	kinetyczna z alkalicznym pikrynianem, metoda standaryzowana względem IDMS	kobiety 44,0 – 80,0 mężczyźni 62,0 – 106,0
Kwas moczowy (μmol/l)	kolorymetryczna z urykazą	kobiety: 143,0 – 340,0 mężczyźni: 202,0 – 416,0
Mocznik (mmol/l)	kinetyczna z ureazą i GLDH	2,76 – 8,07
Cholesterol całkowity (mmol/l)	enzymatyczna CHOD-POD	3,2 – 5,2
Cholesterol-LDL (mmol/l)	wartość wyliczana ze wzoru Friedewalda	0,2 – 3,4
Cholesterol-HDL (mmo/l)	enzymatyczna z esterazą i oksydazą cholesterolową zmodyfikowane przez PEG	0,9 – 3,0
Trójglicerydy (mmol/l)	enzymatyczna, GPO-PAP	0,2 – 2,3
Wapń całkowity (mmol/l)	kolorymetryczna z kompleksem o-krezoftaleiny w środowisku zasadowym	2,02 – 2,61
Fosforany (mmol/l)	z fosfomolibdenianem amonu i kwasem siarkowym	0,81 – 1,45
iPTH (pg/ml)	elektrochemiluminescencji	15,0 – 65,0
Sód (mmol/l)	ISE, pośrednia	136,0 - 145,0
Potas (mmol/l)	ISE, pośrednia	3,50 – 5,1
Chlorki (mmol/l)	ISE, pośrednia	98-106
CRP (mg/l)	immunturbidymetryczna	<5,0

#### **4.3.3.2.4. Dodatkowe badania laboratoryjne wykonywane w surowicy**

U pacjentów przeprowadzono dodatkowo pomiary MMP-9, cystatyny C, uromoduliny, uPAR oraz NGAL w surowicy. Oznaczenia MMP-9, sNGAL i uPAR wykonano w Zakładzie Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej UJ CM w Krakowie z wykorzystaniem zestawów ELISA, natomiast pomiar cystatyny C przeprowadzono w

Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie przy użyciu metody immunonefelometrycznej na analizatorze Nephelometer BNII (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Niemcy). Zakresy wartości referencyjnych dla przedstawionych parametrów zamieszczono w Tabeli 4.

**Tabela 4.**

Zakres wartości referencyjnych dla wybranych parametrów immunochemicznych.

Parametr badany (jednostka)	Nazwa zestawu / metoda (nazwa firmy)	Wartości referencyjne
NGAL w surowicy ( $\mu\text{g/l}$ )	Human Lipocalin-2/NGAL ELISA (BioVendor, Brno, Czechy)	K: 24-50 lat: $75,3 \pm 33,9^*$ 51-83 lat: $64,9 \pm 46,5^*$ M: 19-49 lat: $59,3 \pm 29,7^*$ 50-85 lat: $62,5 \pm 33,4^*$
uPAR w surowicy ( $\mu\text{g/l}$ )	Quantikine ELISA Human uPAR Immunoassay (R&D Systems, McKinley Place, MN, USA)	2,37 (1,19 – 4,42)*
Uromodulina w surowicy ( $\mu\text{g/l}$ )	Human Uromodulin ELISA (BioVendor, Brno, Czechy)	średnia: 241,0* mediana: 244,5*
MMP-9 w surowicy ( $\mu\text{g/l}$ )	Quantikine ELISA Human MMP-9 Immunoassay (R&D Systems, McKinley Place, MN, USA)	436 (169 – 705)*
Cystatyna C (mg/l)	metoda nefelometryczna, analizator Nephelometer BN II (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Niemcy)	0,59 – 1,04

\* zakresy wartości referencyjnych podane przez producentów zestawów; K – kobiety; M - mężczyźni

#### 4.3. Analiza statystyczna

W opisie zmiennych nominalnych podano liczbę pacjentów w danej grupie i odsetek grupy. W opisie zmiennych ilościowych przedstawiono średnią ( $\pm$  odchylenie standardowe) dla zmiennych o rozkładzie normalnym lub medianę (dolny-górny kwartył) dla zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego. Normalność rozkładu zmiennych oceniano testem Shapiro - Wilka. Tabele wielodzzielcze analizowano przy pomocy testu niezależności  $\chi^2$  Pearsona. Różnice między dwiema grupami oceniano odpowiednio testem t - Studenta dla zmiennych niepowiązanych (zmienne o rozkładzie normalnym) lub testem Manna -

Whitney'a (zmienne o rozkładzie różnym od normalnego). Różnice między trzema i więcej grupami badano przy pomocy analizy wariancji (zmienne o rozkładzie normalnym) lub Kruskala - Wallisa (zmienne o rozkładzie różnym od normalnego) z odpowiednimi testami *post-hoc*. Korelacje między zmiennymi oceniono z użyciem współczynnika korelacji rang Spearmana, z uwagi na różny od normalnego rozkład wartości badanych białek specyficznych i markerów uszkodzenia nerek. Wyniki uznano za istotne statystycznie przy wartościach  $p \leq 0,05$ . W analizie statystycznej wykorzystano oprogramowanie Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

## 5. WYNIKI

### 5.1. Charakterystyka grupy badanej

Do badania zakwalifikowano 117 pacjentów (55 kobiet i 62 mężczyzn), chorujących na cukrzycę typu 2 (T2DM), w średnim wieku 61 lat ( $\pm 12$  lat). Mediana czasu trwania cukrzycy w badanej grupie wynosiła 6 (2-10) lat. Mediana filtracji kłębuszkowej szacowanej według wzoru CKD-EPI wynosiła 91 (76-100) ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Maksymalna wartość albuminurii (wskaźnik albumina do kreatyniny w pojedynczej porcji moczu, uACR) wynosiła 152,0 mg/g, zaś mediana 5,3 (2,7-27,0) mg/g.

Szczegółowe dane kliniczne i demograficzne w badanej populacji przedstawiono w Tabeli 5.

**Tabela 5.**

Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych z T2DM.

Parametr badany	Grupa badana	
	Liczba badanych osób	Wyniki
Wiek, lata	117	61 ( $\pm 12$ )
Płeć męska, n (%)	117	55 (47)
BMI, kg/m <sup>2</sup>	117	31,3 ( $\pm 5,7$ )
Czas trwania cukrzycy, lata	117	6 (2-10)
Cukrzyca świeżo wykryta, n (%)	117	14 (12)
HbA <sub>1c</sub> , %	108	6,4 (5,9-7,7)
HbA <sub>1c</sub> $\leq 7,0$ %	108	71 (61)
eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ), ml/min/1,73m <sup>2</sup>	117	91 (77-100)
eGFR >90 ml/min/1,73m <sup>2</sup> , n (%)	117	62 (53)
eGFR 60-90 ml/min/1,73m <sup>2</sup> , n (%)		40 (34)
eGFR 45-60 ml/min/1,73m <sup>2</sup> , n (%)		12 (10)
eGFR 30-45 ml/min/1,73m <sup>2</sup> , n (%)		3 (2)
uACR, mg/g	111	5,2 (2,7-27,0)
uACR <15 mg/g, n (%)	111	75 (66)
uACR 15-30 mg/g, n (%)		10 (9)
uACR 30-300 mg/g, n (%)		26 (23)

Leczenie insuliną, n (%)	117	30 (26)
Leczenie NLPZ, n (%)	117	14 (12)
Leczenie metforminą, n (%)	117	83 (71)
Leczenie ASA, n (%)	117	50 (43)
Leczenie statynami, n (%)	117	65 (56)
Blokada RAA, n (%)	117	73 (62)
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	117	98 (84)
Choroba niedokrwienna serca, n (%)	117	19 (16)
Niewydolność serca, n (%)	117	5 (4)
Miażdżycza uogólniona, n (%)	117	19 (16)
TIA/udar w wywiadzie, n (%)	117	4 (3)
Przebyty ostry zespół wieńcowy, n (%)	117	12 (10)
Retinopatia cukrzycowa, n (%)	85	14 (16)

W dalszej kolejności przeanalizowano wyniki morfologii krwi obwodowej w badanej grupie chorych z T2DM. Dane przedstawiono w Tabeli 6.



**Tabela 6.**

Wyniki morfologii krwi obwodowej w badanej grupie chorych z T2DM.

Parametr badany	Grupa badana	
	Liczba badanych osób	Wyniki
Eryocyty, $10^6/\mu\text{l}$	114	4,64 ( $\pm 0,45$ )
Hemoglobina, g/dl	117	13,8 ( $\pm 1,4$ )
Hematokryt, %	110	41,0 ( $\pm 3,8$ )
MCV, fl	114	88,6 ( $\pm 4,6$ )
MCH, pg	114	29,8 ( $\pm 1,8$ )
MCHC, g/dl	114	33,7 ( $\pm 1,3$ )
RDW-CV, %	114	13,2 ( $\pm 0,9$ )
Płytki krwi, $10^3/\mu\text{l}$	117	232 (201-276)
Leukocyty, $10^3/\mu\text{l}$	117	7,13 (6,22-8,51)
Neutrofile, %	85	61,7 ( $\pm 9,1$ )
Limfocyty, %	85	27,9 ( $\pm 7,8$ )
Monocyty, %	85	6,0 ( $\pm 1,7$ )
Eozynofile, %	84	2,1 (1,1-2,9)
Bazofile, %	84	0,4 (0,3-0,6)

Po przeanalizowaniu wyników badania ogólnego moczu w grupie chorych, wyniki przedstawiono w Tabeli 7.

**Tabela 7.**

Wyniki badania ogólnego moczu w badanej grupie chorych z T2DM.

Parametr badany	Grupa badana	
	Liczba badanych osób	Wyniki
Ciężar właściwy moczu	112	1,020 ( $\pm 0,006$ )
pH moczu	112	5,5 ( $\pm 0,5$ )
Białkomocz, n (%)	112	4 (4)
Glukozyria, n (%)	112	19 (17)
Erytrocyturia, n (%)	112	4 (4)
Bakteriuria, n (%)	112	8 (7)
Leukocyturia, n (%)	112	16 (14)

Wyniki badań biochemicznych wykonanych w surowicy i moczu w badanej grupie przedstawiono w Tabeli 8.

**Tabela 8.**

Wyniki badań biochemicznych w surowicy i moczu w badanej grupie z T2DM.

Parametr badany	Grupa badana	
	Liczba badanych osób	Wyniki
Glukoza, mmol/l,	109	6,6 ( $\pm$ 1,7)
CRP, mg/l	103	3,0 (1,3-5,8)
Kreatynina w surowicy, $\mu$ mol/l	117	68 (60-82)
Albumina w moczu, mg/l	111	52,8 (27,3-26,9)
Kreatynina w moczu, mmol/l	112	8,9 (5,6-13,2)
Cholesterol całkowity, mmol/l	114	4,58 ( $\pm$ 1,16)
LDL-cholesterol, mmol/l	114	2,57 ( $\pm$ 0,98)
HDL-cholesterol, mmol/l	114	1,4 ( $\pm$ 0,3)
Trójglicerydy, mmol/l	114	1,55 (1,15-2,05)
ALT, U/l	78	23 (17-39)
K, mmol/l	102	4,2 ( $\pm$ 0,3)
Na, mmol/l	102	136 ( $\pm$ 3)
Cl, mmol/l	101	102 ( $\pm$ 3)
Ca, mmol/l	39	2,3 ( $\pm$ 0,1)
iPTH, pg/ml	13	17,42 (3,00-26,90)
Fosforany nieorganiczne, mmol/l	24	1,13 (0,96-0,12)
Kwas moczowy, $\mu$ mol/l	77	326 ( $\pm$ 104)

U części chorych z T2DM zmierzono w moczu stężenie uKIM-1, uUMOD, uL-FABP, uIgG, uTRF, uNGAL, u $\beta$ 2M. W dalszej kolejności obliczono wskaźniki: uKIM-1/uCr, uUMOD/uCr, uL-FABP/uCr, uNGAL/uCr. Wykonano również oznaczenia uromoduliny, NGAL oraz cystatyny C w surowicy. Wyniki przeprowadzonych badań w grupie chorych z T2DM przedstawiono w Tabeli 9.

**Tabela 9.**

Wyniki badań wybranych markerów w surowicy i w moczu w badanej grupie z T2DM.

Parametr badany	Grupa badana	
	Liczba badanych osób	Wyniki
uKIM-1, $\mu\text{g/l}$	104	1,04 (0,47-1,66)
uKIM-1/uCr, $\mu\text{g/g}$	98	1,16 (0,59-1,66)
uUMOD, $\text{mg/l}$	103	7,07 (3,22-14,40)
uUMOD/uCr, $\text{mg/g}$	98	7,90 (3,26-16,82)
sUMOD, $\mu\text{g/l}$	102	127 (88-173)
uL-FABP, $\mu\text{g/l}$	75	2,26 (1,95-3,01)
uL-FABP/uCr, $\mu\text{g/g}$	75	2,47 (1,58-4,49)
uIgG powyżej progu detekcji, n (%)	104	27 (26)
uTRF powyżej progu detekcji, n (%)	104	15 (14)
uNGAL, $\mu\text{g/l}$	109	13,5 (6,1-27,1)
uNGAL/uCr, $\mu\text{g/g}$	104	12,2 (5,1-25,9)
sNGAL, $\mu\text{g/l}$	78	59,6 (43,7-72,1)
sCysC, $\text{mg/l}$	78	0,91 (0,79-1,07)
eGFR (CKD-EPI <sub>CysC</sub> ), $\text{ml/min/1,73m}^2$	117	91 (77-100)
uPAR, $\mu\text{g/l}$	78	2,66 (2,19-3,07)
sMMP-9, $\mu\text{g/l}$	26	952 (646-1857)
u $\beta$ 2M powyżej progu detekcji, n (%)	26	4 (15)

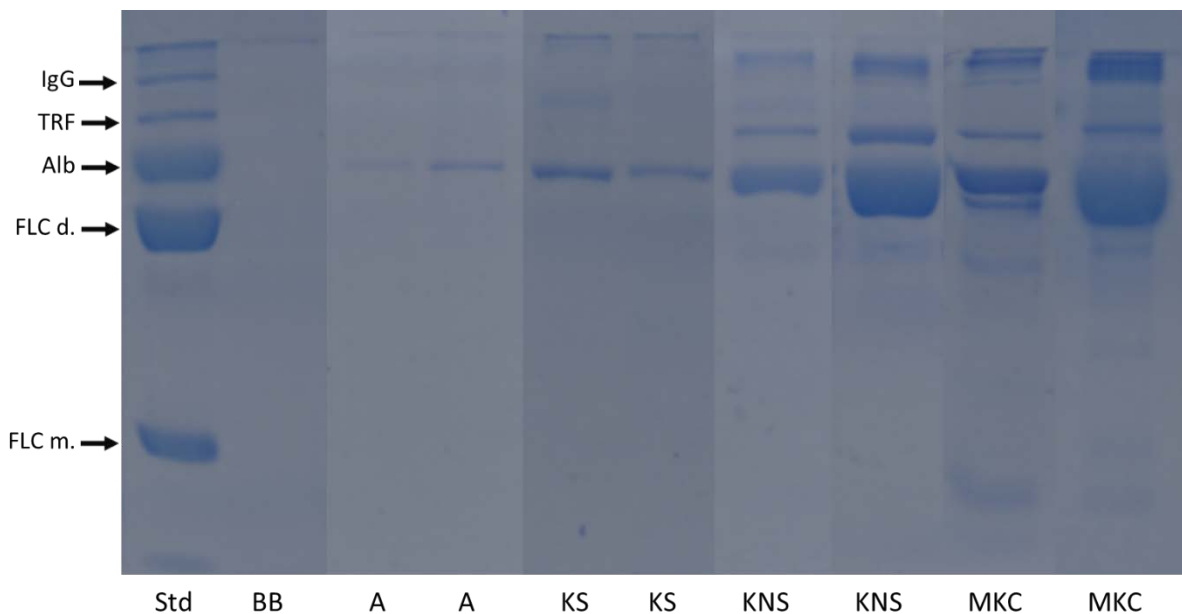
## 5.2. Porównanie pacjentów z różnymi wynikami elektroforezy białek moczu

W badanej grupie, u 117 pacjentów wykonano elektroforezę białek w moczu. Ze względu na wynik elektroforezy, grupę badaną podzielono na następujące podgrupy:

- BB – pacjenci, u których nie stwierdzono obecności białka w moczu – 23 pacjentów (20%),
- A – pacjenci, u których stwierdzono obecność słabego prążka albuminy, brak innych białek – 72 pacjentów (62%),

- KS – pacjenci, u których stwierdzono obecność silnego prążka albuminy bez obecności innych białek (obraz klasyfikowany jako białkomocz kłębuszkowy selektywny) – 12 pacjentów (10%),
- KNS – pacjenci, u których stwierdzono obecność silnego prążka albuminy oraz obecność białek o masie cząsteczkowej większej od masy cząsteczkowej albuminy (obraz klasyfikowany jako białkomocz kłębuszkowy nieselektywny) – 5 pacjentów (4%),
- MKC – pacjenci, u których stwierdzono obecność albuminy i białek o większej masie cząsteczkowej (co wskazuje na białkomocz kłębuszkowy nieselektywny) oraz białek drobnocząsteczkowych (co wskazuje na białkomocz cewkowy; obraz klasyfikowany jako białkomocz kłębuszkowo-cewkowy) – 5 pacjentów (4%).

Przykłady rozdziałów elektroforetycznych odpowiadających poszczególnym kategoriom przedstawiono na Rycinie 1.



### Rycina 1.

Przykłady rozdziałów elektroforetycznych białek moczu, przypisanych do poszczególnych kategorii wyników: BB – brak białka w elektroforezie; A – obecność śladowego prążka albuminy; KS – białkomocz kłębuszkowy selektywny; KNS – białkomocz kłębuszkowy nieselektywny; MKC – białkomocz mieszany kłębuszkowo-cewkowy; Std – standard mas cząsteczkowych: IgG – immunoglobulina G (masa molowa ok. 150 kDa); TRF – transferyna (masa molowa ok. 75 kDa); Alb – albumina (masa molowa ok. 65 kDa); FLC d. – łańcuchy lekkie immunoglobulin w formie dimeru (masa molowa ok. 50 kDa); FLC m. – łańcuchy lekkie immunoglobulin w formie monomeru (masa molowa ok. 25 kDa)

Ze względu na niewielką liczebność podgrup (KS, KNS i MKC), do celów analizy statystycznej połączono te trzy podgrupy w jedną grupę pacjentów z białkomoczem kłębuszkowym (K). Następnie przeanalizowano różnicę między podgrupami: BB, A oraz K. Wyodrębnione na podstawie wyników elektroforezy grupy były zbliżone pod względem wieku. Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami w zakresie wskaźnika filtracji kłębuszkowej oszacowanego według wzoru CKD-EPI. Grupy różniły się natomiast w sposób istotny statystycznie wartością wskaźnika uACR.

W Tabeli 10 przedstawiono szczegółowe dane demograficzne w podgrupach chorych z T2DM utworzonych na podstawie uzyskanego wyniku elektroforezy białek moczu. Szczegółowe porównanie wieku, czasu trwania T2DM, wartości eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>) i uACR w zależności od wyników elektroforezy białek moczu przedstawiono na Rycinie 2.

**Tabela 10.**

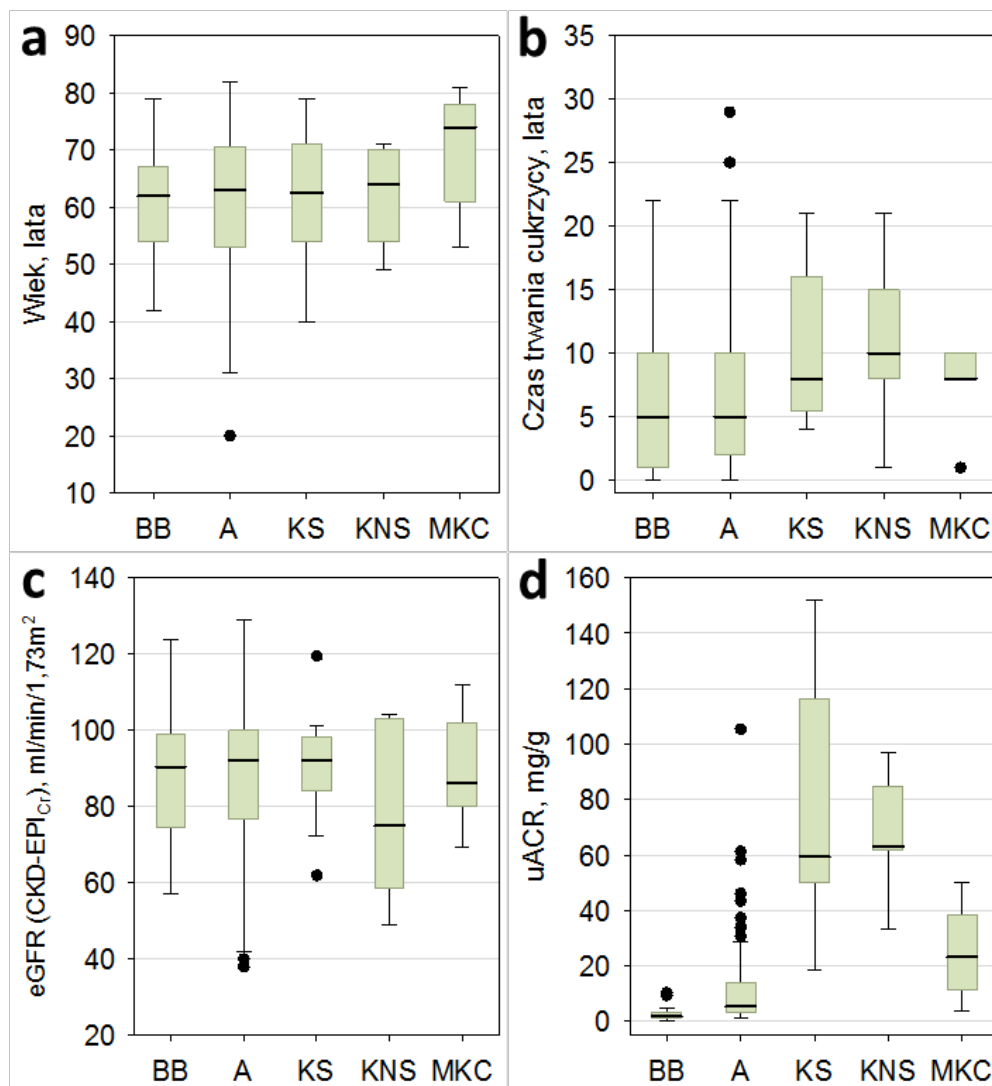
Dane demograficzne w podgrupach chorych z T2DM utworzonych na podstawie uzyskanego wyniku elektroforezy białek moczu.

Parametr badany	Brak białka w elektroforezie (BB)	Ślad albuminy w elektroforezie (A)	Białkomocz kłębuszkowy (K)	p
Wiek, lata	60 (±9)	61 (±13)	64 (±11)	0,6
Płeć męska, n (%)	11 (48)	35 (49)	9 (41)	0,8
BMI, kg/m <sup>2</sup>	31,8 (±4,7)	31,4 (±5,6)	30,4 (±7,2)	0,5
Czas trwania cukrzycy, lata	5 (1-10)	5 (2-10)	8 (6-15)	0,08
eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ), ml/min/1,73m <sup>2</sup>	90 (75-99)	92 (77-100)	91 (75-101)	0,9
uACR, mg/g	1,8 (1,2-3,2)	5,3 (3,4-14,1)	57,7 (37,3-78,7)	<0,001 <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowy a grupą bez obecności białka w elektroforezie białek moczu

<sup>b</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowy a grupą ze śladem albuminy w moczu

<sup>c</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą ze śladem albuminy w moczu a grupą bez obecności białka w elektroforezie białek moczu



**Rycina 2.**

Wiek (a), czas trwania T2DM (b), wartości eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>) (c) oraz uACR (d) w zależności od rodzaju białkomoczu wyodrębnionego na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu. Dane na rycinach przedstawiono jako medianę, zakres międzykwartyłowy (ramka), zakres wartości nieodstających (wąsy) i wartości odstające (punkty).

Ponadto przeanalizowano różnice pomiędzy podgrupami wyodrębnionymi na podstawie badania elektroforezy białek dotyczące wyników badania morfologicznego krwi obwodowej. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę odsetka limfocytów w rozmazie krwi obwodowej pomiędzy grupą chorych z białkomoczem kłębuszkowym (KC), a grupą bez obecności białka w elektroforezie (BB). Porównanie parametrów morfologii krwi obwodowej pomiędzy badanymi podgrupami przedstawione zostało w Tabeli 11.

**Tabela 11.**

Porównanie parametrów morfologii krwi obwodowej pomiędzy badanymi podgrupami wyodrębnionymi na podstawie elektroforezy białek moczu.

<b>Parametr badany</b>	<b>Brak białka w elektroforezie (BB)</b>	<b>Ślad albuminy w elektroforezie (A)</b>	<b>Białkomocz kłębuszkowy (K)</b>	<b>p</b>
Hemoglobina, g/dl	13,6 (±1,3)	13,9 (±1,4)	13,5 (±1,2)	0,3
Leukocyty, 10 <sup>3</sup> /μl	6,60 (5,88-7,78)	7,19 (6,32-8,41)	7,37 (6,35-9,83)	0,1
Płytki krwi, 10 <sup>3</sup> /μl	242 (194-281)	231 (202,5-275)	239 (201-282)	0,9
Neutrofile, %	58,5 (±11,2)	60,9 (±8,8)	65,4 (±7,5)	0,08
Limfocyty, %	29,3 (±8,6)	28,1 (±7,5)	23,3 (±7,0)	0,023 <sup>a</sup>
Monocyty, %	6,7 (±2,4)	5,7 (±1,4)	6,3 (±1,7)	0,2

<sup>a</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowym a grupą bez obecności białka w elektroforezie białek moczu

W wyodrębnionych grupach przeanalizowano także wyniki badania ogólnego moczu. Obecność białka w badaniu ogólnym moczu stwierdzono u trzech chorych w grupie z białkomoczem kłębuszkowym, w tym u jednego pacjenta z podgrupy KS, jednego z KNS i jednego z MKC. Bakteriurię i erytrocyturię obserwowano statystycznie częściej w podgrupie K w stosunku do podgrupy BB. Analizę wyników badania ogólnego moczu w podgrupach wyodrębnionych na podstawie elektroforezy białek moczu przedstawiono w Tabeli 12.



**Tabela 12.**

Wyniki badania ogólnego moczu w podgrupach wyodrębnionych na podstawie elektroforezy białek.

Parametr badany	Brak białka w elektroforezie (BB)	Ślad albuminy w elektroforezie (A)	Białkomocz kłębuszkowy (K)	p
Ciężar właściwy moczu	1,019 ( $\pm 0,007$ )	1,020 ( $\pm 0,005$ )	1,020 ( $\pm 0,007$ )	0,6
pH moczu	5,54 ( $\pm 0,60$ )	5,43 ( $\pm 0,57$ )	5,5 ( $\pm 0,53$ )	0,9
Białkomocz, n (%)	1 (5)	0	3 (15)	0,006 <sup>b</sup>
Głukozuria, n (%)	5 (23)	8 (11)	6 (30)	0,1
Erytrocyturia, n (%)	0	1 (1)	3 (15)	0,009 <sup>b</sup>
Bakteriuria, n (%)	0	4 (6)	4 (20)	0,031 <sup>a</sup>
Leukocyturia, n (%)	1 (5)	10 (14)	5 (25)	0,2

<sup>a</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowym a grupą bez obecności białka w elektroforezie białek moczu

<sup>b</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowym a grupą ze śladem albuminy w moczu

W przeprowadzanej analizie badań biochemicznych w grupach wyodrębnionych na podstawie elektroforezy białek moczu, stwierdzono istotną statystycznie różnicę w zakresie wartości HbA<sub>1c</sub> pomiędzy grupą K, a grupą chorych A. Wszystkie trzy grupy różniły się również istotnie stężeniem albuminy oznaczonym w pojedynczej porcji moczu.

Wyniki badań biochemicznych w podgrupach wyodrębnionych na podstawie elektroforezy białek moczu przedstawiono w Tabeli 13. Z kolei Rycina 3 przedstawia szczegółowe porównanie odsetka HbA<sub>1c</sub> i stężenia albuminy z moczu między podgrupami chorych, z uwzględnieniem podgrup KS, KNS i MKC.

**Tabela 13.**

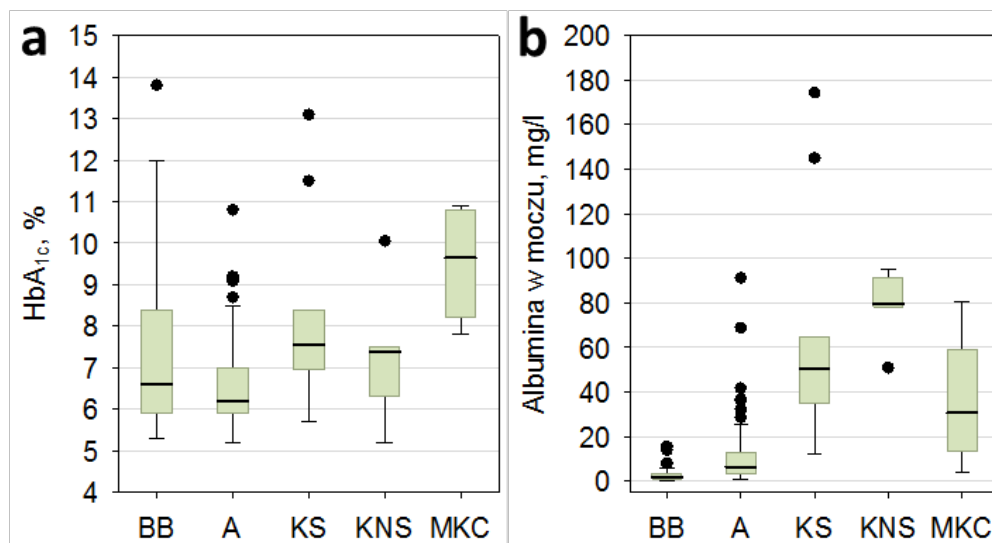
Porównanie wyników badań biochemicznych i podgrup wyodrębnionych na podstawie elektroforezy białek moczu.

Parametr badany	Brak białka w elektroforezie (BB)	Ślad albuminy w elektroforezie (A)	Białkomocz kłębuszkowy (K)	p
Glukoza, mmol/l	6,66 (±1,44)	6,32 (±1,05)	7,52 (±3,33)	0,2
CRP, mg/l	3,90 (1,60-5,80)	2,60 (1,30-5,20)	4,05 (2,30-7,40)	0,3
Kreatynina w surowicy, μmol/l	62 (53-70)	70 (53-79)	62 (53-79)	0,5
HbA <sub>1c</sub> , %	6,6 (5,9-8,4)	6,6 (5,9-7,0)	8,2 (6,9-10,0)	0,003 <sup>b</sup>
Albumina w moczu, mg/l	1,7 (0,9-3,4)	6,3 (3,3-12,8)	51,5 (36,3-80,0)	0,001 <sup>a,b,c</sup>
Kreatynina w moczu, mmol/l	7,1 (4,4-12,3)	8,8 (5,3-13,3)	7,9 (6,2-12,3)	0,6
Cholesterol całkowity, mmol/l	4,94 (±1,16)	4,70 (±1,08)	4,80 (±1,32)	0,8
LDL-cholesterol, mmol/l	2,80 (±1,06)	2,69 (±1,01)	2,64 (±1,01)	0,8
HDL-cholesterol, mmol/l	1,24 (±0,26)	1,26 (±0,21)	1,32 (±0,47)	0,9
Trójglicerydy, mmol/l	1,60 (1,20-2,32)	1,53 (1,10-2,03)	1,62 (1,17-2,07)	0,6

<sup>a</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowym a grupą bez obecności białka w elektroforezie białek moczu

<sup>b</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowym a grupą ze śladem albuminy w moczu

<sup>c</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą ze śladem albuminy w moczu a grupą bez obecności białka w elektroforezie białek moczu



### Rycina 3.

Wartości HbA<sub>1c</sub> (a) oraz stężenia albuminy w pojedynczej porcji moczu (b) w zależności od rodzaju białkomoczu wyodrębnionego na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu. Dane na rycinach przedstawiono jako medianę, zakres międzykwartyłowy (ramka), zakres wartości nieodstających (wąsy) i wartości odstające (punkty).

W wyodrębnionych na podstawie badania elektroforezy białek moczu grupach analizowano również różnice dotyczące wskaźników uszkodzenia nerek. W grupie chorych K stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie KIM-1 w moczu oraz wskaźnika uKIM1/uCr w porównaniu do grup A oraz BB. Stwierdzono także istotnie wyższe stężenie uromoduliny w moczu w grupie pacjentów z białkomoczem kłębuszkowym w odniesieniu do chorych z grupy ze śladem albuminy. Również stężenie NGAL w moczu oraz wartość wskaźnika uNGAL/uCr było istotnie statystycznie większe w grupie z białkomoczem kłębuszkowym niż w grupie chorych bez obecnego w elektroforezie białka. Ponadto, w grupie chorych z białkomoczem kłębuszkowym w porównaniu do dwóch pozostałych grup stwierdzono największą statystycznie liczbę chorych ze zwiększonym wydalaniem zarówno IgG, jak i transferyny z moczem. W Tabeli 14 przedstawiono dane dotyczące porównania wskaźników uszkodzenia nerek w podgrupach wyodrębnionych na podstawie wyników elektroforezy białek moczu. Szczegółowe dane dotyczące istotnych statystycznie różnic wartości wskaźników uszkodzenia nerek w podgrupach wyodrębnionych na podstawie wyników elektroforezy białek moczu przedstawiono na Rycinach 4 i 5.

**Tabela 14.**

Porównanie wskaźników uszkodzenia nerek w podgrupach wyodrębnionych na podstawie wyników elektroforezy białek moczu.

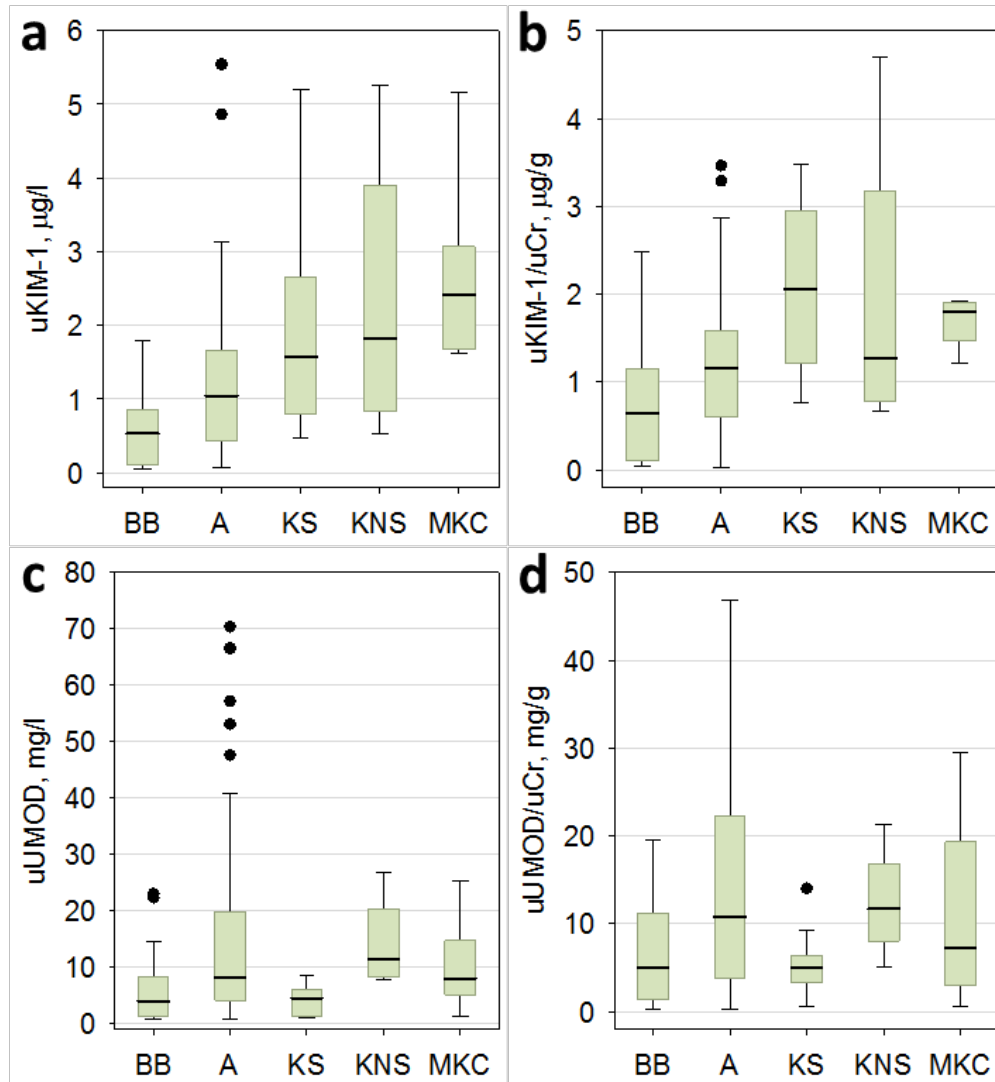
Parametr badany	Brak białka w elektroforezie (BB)	Ślad albuminy w elektroforezie (A)	Białkomocz kłębuszkowy (K)	p
uKIM-1, µg/l	0,53 (0,10-0,86)	1,04 (0,43-1,65)	1,64 (1,11-2,86)	<0,001 <sup>a,b,c</sup>
uKIM-1/uCr, µg/g	0,64 (0,10-1,15)	1,15 (0,59-1,58)	1,79 (1,21-2,77)	<0,001 <sup>a,b,c</sup>
uUMOD, mg/l	4,02 (1,17-8,23)	8,17 (4,13-19,78)	5,79 (2,79-8,65)	0,011 <sup>b</sup>
uUMOD/uCr, mg/g	5,01 (1,42-11,2)	10,82 (3,79-22,29)	8,21 (4,39-11,05)	0,010 <sup>b</sup>
sUMOD, µg/l	134 (108-176)	124 (88-173)	138 (57-179)	0,9
uL-FABP, µg/l	2,71 (2,25-3,01)	2,25 (1,87-2,86)	2,33 (1,79-3,59)	0,3
uL-FABP/uCr, µg/g	2,51 (1,59-4,85)	2,37 (1,48-4,15)	2,93 (2,27-3,83)	0,7
uIgG powyżej progu detekcji, n (%)	0	10 (16)	17 (85)	<0,001 <sup>a,b</sup>
uTRF powyżej progu detekcji, n (%)	0	1 (2)	14 (70)	<0,001 <sup>a,b</sup>
uNGAL, µg/l	8,7 (2,3-16,7)	13,9 (6,1-26,3)	23,2 (11,5-37,1)	0,008 <sup>a</sup>
uNGAL/uCr, µg/g	7,1 (2,1-16,2)	12,0 (5,4-26,8)	22,3 (14,3-38,9)	0,004 <sup>a</sup>
sNGAL, µg/l	67,1 (45,8-74,6)	54,4 (45,5-68,0)	62,4 (41,1-103,0)	0,4
sCysC, mg/l	0,82 (0,78-0,99)	0,92 (0,79-1,05)	1,07 (0,83-1,15)	0,2
eGFR (CKD-EPI <sub>CysC</sub> ), ml/min/1,73m <sup>2</sup>	90 (74-99)	92 (76-100)	91 (75-101)	0,5
uPAR, µg/l	2,52 (2,22-3,13)	2,52 (2,10-2,97)	2,89 (2,72-3,47)	0,1
sMMP-9, µg/l	646*	1129 (718-2081)	2893 (2716-3471)	0,3
uβ2M powyżej progu detekcji, n (%)	0*	2 (11)	2 (29)	0,5

<sup>a</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowym a grupą bez obecności białka w elektroforezie białek moczu

<sup>b</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z białkomoczem kłębuszkowym a grupą ze śladem albuminy w moczu

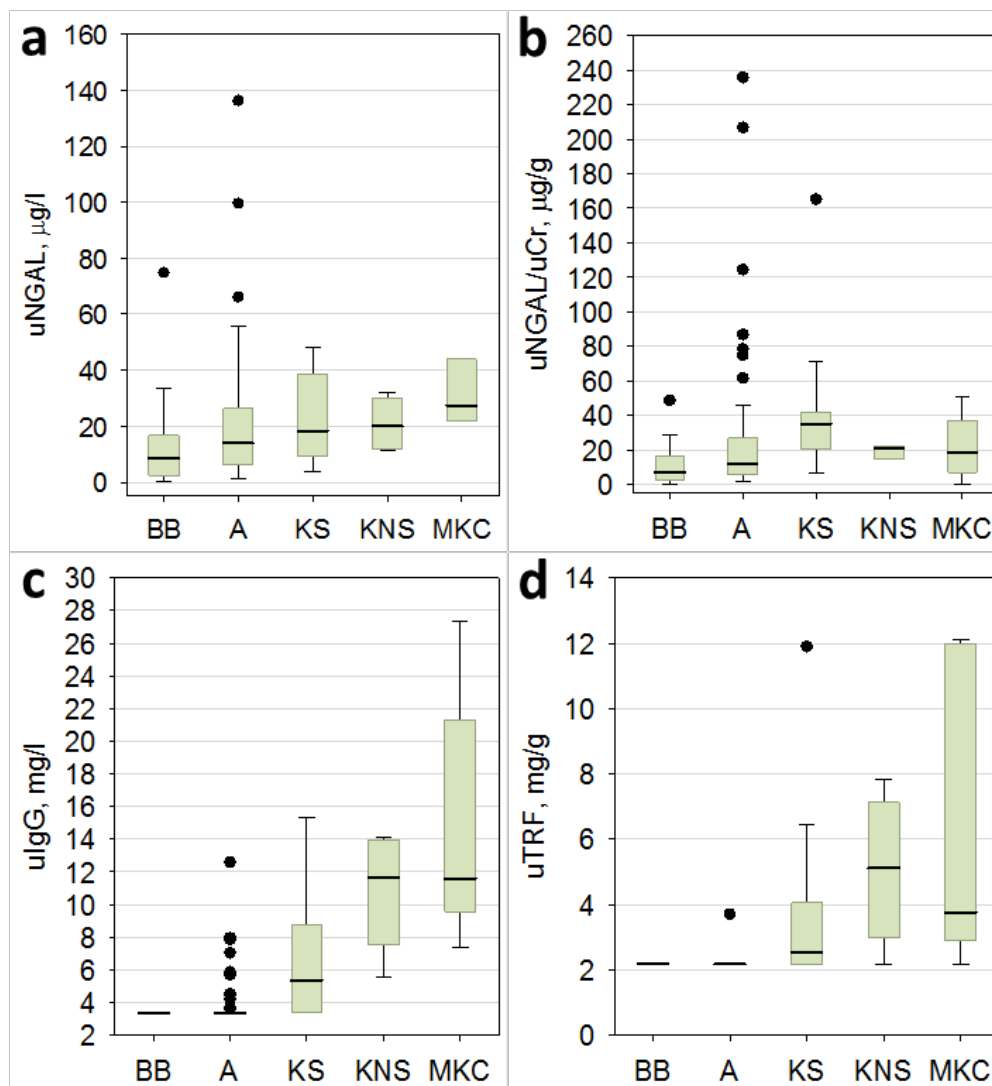
<sup>c</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą ze śladem albuminy w moczu a grupą bez obecności białka w elektroforezie białek moczu

\*sMMP-9 i u $\beta$ 2M oznaczono tylko u jednej osoby z grupy z ujemnym wynikiem elektroforezy białek moczu



**Rycina 4.**

Stężenia uKIM-1 (a) i uUMOD (c) oraz wartości wskaźników uKIM-1/uCr (b) i uUMOD/uCr (d) w zależności od rodzaju białkomoczu wyodrębnionego na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu. Dane na rycinach przedstawiono jako medianę, zakres międzykwartyłowy (ramka), zakres wartości nieodstających (wąsy) i wartości odstające (punkty).



**Rycina 5.**

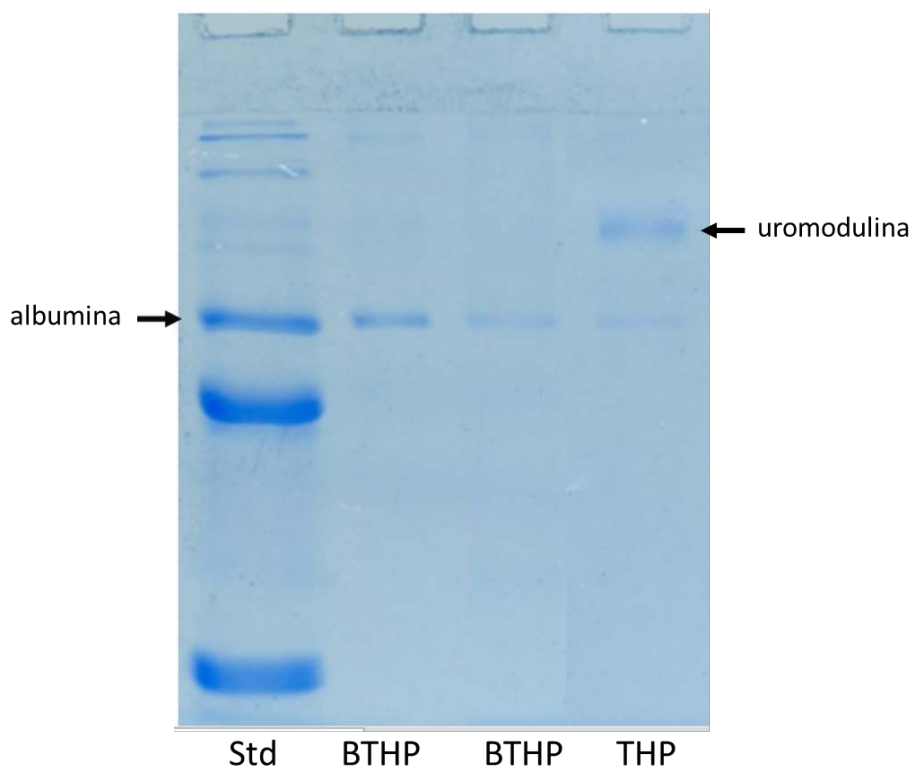
Stężenia uNGAL (a), wartości wskaźnika uNGAL/Cr (b) oraz stężenia IgG (c) i transferyny (d) w moczu pacjentów zależność od rodzaju białkomoczu wyodrębnionego na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu. Dane na rycinach przedstawiono jako medianę, zakres międzykwartylowy (ramka), zakres wartości nieodstających (wąsy) i wartości odstające (punkty).

### 5.3. Porównanie pacjentów w zależności od obecności uromoduliny w badaniu elektroforezy białek

Na podstawie wyników badania elektroforezy białek moczu chorych z T2DM, spośród których wykluczono pacjentów z podgrupy BB, wyodrębniono 2 grupy chorych:

- BTHP – pacjenci, u których w elektroforezie nie wykazano prążka uromoduliny,
- THP – pacjenci, u których w elektroforezie stwierdzono obecność prążka uromoduliny.

Przykłady rozdziałów elektroforetycznych białek moczu z nieobecnym i z widocznym prążkiem uromoduliny przedstawiono na Rycinie 6. Prążek uromoduliny towarzyszył najczęściej słabemu prążkowi albuminy: w podgrupie chorych A obecność uromoduliny w elektroforezie białek moczu stwierdzono u 29 pacjentów, tj. 40% chorych, natomiast w podgrupie K u 4, tj. 18% chorych, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie ( $p=0,06$ ).



### Rycina 6.

Przykładowe rozdziały elektroforetyczne białek moczu z obecnością prążka uromoduliny (THP) i z niewykrywalną uromoduliną (BTHP). Std – standard mas cząsteczkowych.

W grupie THP obserwowano niższe stężenie CRP, NGAL, uPAR w surowicy, większe wydalanie kreatyniny z moczem oraz niższą wartość wskaźników: uACR, uKIM-1/uCr, uL-FABP/uCr. Były to zależności istotne statystycznie. Stwierdzono również wyższe stężenie uromoduliny w surowicy. Szczegółowe dane dotyczące istotnych statystycznie różnic między grupami zamieszczono w Tabeli 15.

**Tabela 15.**

Istotne statystycznie różnice między podgrupami wyodrębnionymi ze względu na obecność prążka uromoduliny w badaniu elektroforezy białek moczu, dotyczące wyników badania morfologii krwi obwodowej, badań biochemicznych oraz wskaźników uszkodzenia nerek. Z porównania wykluczono chorych, u których w elektroforezie białek moczu nie stwierdzono obecności białka (włączonych do podgrupy BB).

Parametr badany	THP	BTHP	p
Hemoglobina, g/dl	14,4 ( $\pm$ 1,2)	13,5 ( $\pm$ 1,4)	0,002
CRP, mg/l	1,8 (0,9-4,3)	3,5 (1,6-6,3)	0,021
Kreatynina w moczu, $\mu$ mol/l	11,9 (8,0-14,0)	8,1 (5,5-12,5)	0,016
uACR, mg/g	4,7 (2,6-17,1)	13,5 (5,2-43,5)	0,007
uKIM-1/uCr, $\mu$ g/g	1,01 (0,59-1,32)	1,31 (0,98-1,89)	0,041
uUMOD, mg/l	20,10 (8,90-35,56)	5,60 (2,48-8,97)	<0,001
uUMOD/uCr, mg/g	22,09 (10,26-26,61)	5,64 (3,26-12,33)	<0,001
sUMOD, $\mu$ g/l	152 (123-216)	115 (79-160)	0,004
L-FABP/uCr, $\mu$ g/g	2,10 (1,36-3,15)	3,44 (1,84-4,57)	0,025
uIgG powyżej progu detekcji, n (%)	3 (12)	24 (42)	0,009
sNGAL $\mu$ g/l	49,7 (36,5-57,3)	60,6 (45,5-74,1)	0,045
uPAR, $\mu$ g/l	2,10 (1,68-2,81)	2,78 (2,37-3,13)	0,009

#### 5.4. Porównanie pacjentów w zależności od wartości wskaźnika albumina do kreatyniny w pojedynczej porcji moczu (uACR)

W grupie pacjentów z T2DM wyróżniono dwie podgrupy różniące się wartościami uACR:

- chorzy z prawidłową lub nieznacznie podwyższoną albuminurią (uACR <30 mg/g);
- chorzy z umiarkowanie podwyższoną albuminurią (uACR 30-300 mg/g).

Podgrupy te nie różniły się istotnie pod względem wieku, BMI, czasu trwania cukrzycy, wartości wskaźnika filtracji kłębuszkowej, czy wyniku badania morfologii krwi obwodowej. W Tabeli 16 przedstawiono dane demograficzne i kliniczne badanych chorych z T2DM podzielonych na podgrupy w zależności od wartości uACR.



**Tabela 16.**

Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych z T2DM podzielonych na podgrupy w zależności od wartości uACR.

Parametr badany	uACR <30 mg/g	uACR 30-300 mg/g	p
Wiek, lata	60 ( $\pm$ 11)	64 ( $\pm$ 11)	0,1
Płeć męska, n (%)	42 (49)	11 (42)	0,5
BMI, kg/m <sup>2</sup>	31 (5)	30 (6)	0,2
Czas trwania cukrzycy, lata	5 (2-10)	8 (4-12)	0,07
eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ), ml/min/1,73m <sup>2</sup>	92 (76-101)	86 (72-99)	0,3

Analizę przeprowadzono także pomiędzy wyodrębnionymi podgrupami a wynikami morfologii krwi obwodowej, nie stwierdzając istotnych zależności. Porównanie pomiędzy badanymi podgrupami, a parametrami morfologii krwi przedstawione są w Tabeli 17.

**Tabela 17.**

Wyniki wybranych parametrów morfologii krwi obwodowej w podgrupach chorych wyodrębnionych w zależności od wartości uACR.

Parametr badany	uACR <30 mg/g	uACR 30-300 mg/g	p
Hemoglobina, g/dl	13,9 ( $\pm$ 1,3)	13,3 ( $\pm$ 1,3)	0,07
Leukocyty, 10 <sup>3</sup> / $\mu$ l	7,06 (6,12-8,3)	7,7 (6,6-9,6)	0,07
Płytki krwi, 10 <sup>3</sup> / $\mu$ l	134 (194-275)	243 (201-282)	0,9
Neutrofile, %	61,1 (9,6)	62,2 (7,7)	0,6
Limfocyty, %	27,8 (7,9)	26,0 (7,6)	0,3
Monocyty, %	5,9 (1,7)	6,3 (1,8)	0,5

W podgrupie z uACR 30-300 mg/g u czterech chorych stwierdzono erytrocyturię i bakteriurię, zaś u ośmiu chorych leukocyturię. W podgrupie z uACR <30 mg/g u żadnego z chorych nie obserwowano erytrocyturii, bakteriurię stwierdzono tylko u jednego pacjenta, a leukocyturię u pięciu chorych. Były to różnice istotne statystycznie. Analizę wyników badania ogólnego moczu w podgrupach wyodrębnionych w zależności od wskaźnika uACR przedstawiono w Tabeli 18.

**Tabela 18.**

Wyniki badania ogólnego moczu w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od wartości wskaźnika uACR.

Parametr badany	uACR <30 mg/g	uACR 30-300 mg/g	p
Ciężar właściwy moczu	1020 ( $\pm$ 5)	1018 ( $\pm$ 6)	0,2
pH moczu	5,4 ( $\pm$ 0,5)	5,5 ( $\pm$ 0,6)	0,8
Białkomocz, n (%)	1 (1)	2 (8)	0,06
Glukozeria, n (%)	13 (16)	3 (12)	0,7
Erytrocyturia, n (%)	0	4 (17)	0,002
Bakteriuria, n (%)	1 (1)	4 (17)	0,002
Leukocyturia, n (%)	5 (6)	8 (33)	<0,001

Wyodrębnione podgrupy nie różniły się istotnie pod względem wartości HbA<sub>1c</sub>, lipidogramu, czy stężenia kreatyniny w surowicy. Szczegółowe wyniki badań biochemicznych w podgrupach wyodrębnionych na podstawie wskaźnika uACR przedstawiono w Tabeli 19.

**Tabela 19**

Wyniki badań biochemicznych w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od wartości uACR.

Parametr badany	uACR <30 mg/g	uACR 30-300 mg/g	p
Glukoza, mmol/l	6,6 ( $\pm$ 1,9)	6,5 ( $\pm$ 1,1)	0,9
CRP, mg/l	2,8 (1,3-5,2)	4,1 (1,9-7,5)	0,053
Kreatynina w surowicy, $\mu$ mol/l	68 (60,9-81,3)	68,9 (59,2-83,9)	0,9
HbA <sub>1c</sub> , %	6,3 (5,9-7,5)	6,8 (6,0-7,7)	0,5
Kreatynina w moczu, mmol/l	8,84 (5,3-13,2)	7,07 (4,42-11,4)	0,1
Cholesterol całkowity, mmol/l	4,70 ( $\pm$ 1,16)	4,60 ( $\pm$ 1,08)	0,4
LDL-cholesterol, mmol/l	2,71( $\pm$ 1,06)	2,64 ( $\pm$ 0,82)	0,9
HDL-cholesterol, mmol/l	1,26 ( $\pm$ 0,23)	1,39 ( $\pm$ 0,41)	0,2
Trójglicerydy, mmol/l	1,52 (1,15-1,96)	1,70 (1,14-2,18)	0,4

Istotne statystycznie różnice między grupami chorych wyróżnionymi ze względu na wartość uACR obserwowano w przypadku NGAL w moczu, uPAR w surowicy oraz wskaźników uNGAL/Cr i uL-FABP/Cr. Stężenie cystatyny C w surowicy było istotnie statystycznie niższe w grupie z niską albuminurią w porównaniu do grupy z umiarkowanie podwyższoną albuminurią, natomiast wskaźnik filtracji kłębuszkowej oszacowany na podstawie stężenia cystatyny C w surowicy był istotnie wyższy w grupie z uACR <30 mg/g. Były to również zależności istotne statystycznie. W grupie z niską albuminurią, u ośmiu chorych stwierdzono obecność IgG w moczu, natomiast w grupie z uACR 30-300 mg/g liczba chorych z obecnością uIgG była dwukrotnie większa. W podgrupie z uACR <30 mg/g również rzadziej wykrywano obecność transferyny w moczu. Te różnice między grupami były istotne statystycznie.

W Tabeli 20 przedstawiono szczegółowe porównanie wskaźników uszkodzenia nerek w podgrupach wyodrębnionych na podstawie wartości uACR.

**Tabela 20.**

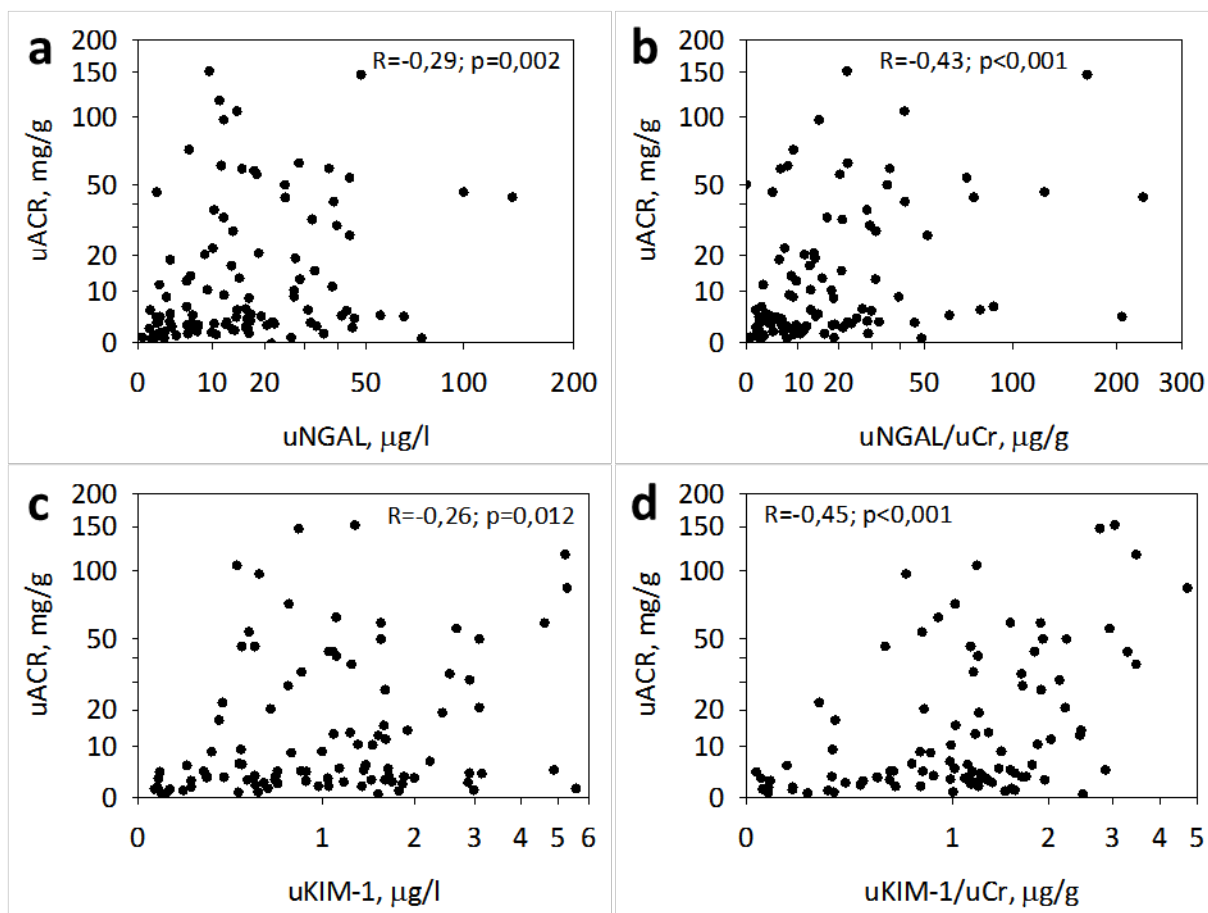
Wyniki badań markerów uszkodzenia nerek w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od wartości wskaźnika uACR.

Parametr badany	uACR <30 mg/g	uACR 30-300 mg/g	p
uKIM-1, µg/l	0,86 (0,42-1,62)	1,11 (0,73-2,65)	0,06
uKIM-1/Cr, µg/g	1,01 (0,43-1,44)	1,81 (1,14-2,94)	<0,001
uUMOD, mg/l	7,08 (2,50-15,94)	7,07 (4,38-13,78)	0,9
uUMOD/Cr, mg/g	7,73 (2,71-18,84)	9,32 (5,01-16,76)	0,5
sUMOD, µg/l	131 (83-179)	132 (93-149)	0,5
uL-FABP, µg/l	2,25 (1,94-3,01)	2,10 (1,79-3,15)	0,4
uL-FABP/uCr, µg/g	2,37 (1,48-3,94)	3,77 (2,44-8,67)	0,026
uIgG powyżej progu detekcji, n (%)	8 (11)	16 (70)	<0,001
uTRF powyżej progu detekcji, n (%)	2 (3)	11 (48)	<0,001
uNGAL, µg/l	12,1 (3,9-21,6)	18,0 (11,5-37,8)	0,009
uNGAL/uCr, µg/g	9,8 (4,0-18,8)	25,4 (14,8-41,7)	<0,001
sNGAL, µg/l	53,7 (40,6-70,4)	66,9 (55,0-96,8)	0,07

sCysC, mg/l	0,86 (0,78-1,01)	1,12 (0,83-1,37)	0,005
eGFR (CKD-EPI <sub>CysC</sub> ), ml/min/1,73m <sup>2</sup>	92 (76-101)	74 (62-97)	0,028
uPAR, µg/l	2,45 (2,10-2,90)	2,93 (2,80-3,49)	0,003
sMMP-9, µg/l	1011 (666-1959)	998 (766-1857)	0,9
uβ2M powyżej progu detekcji, n (%)	2 (12)	2 (22)	0,5

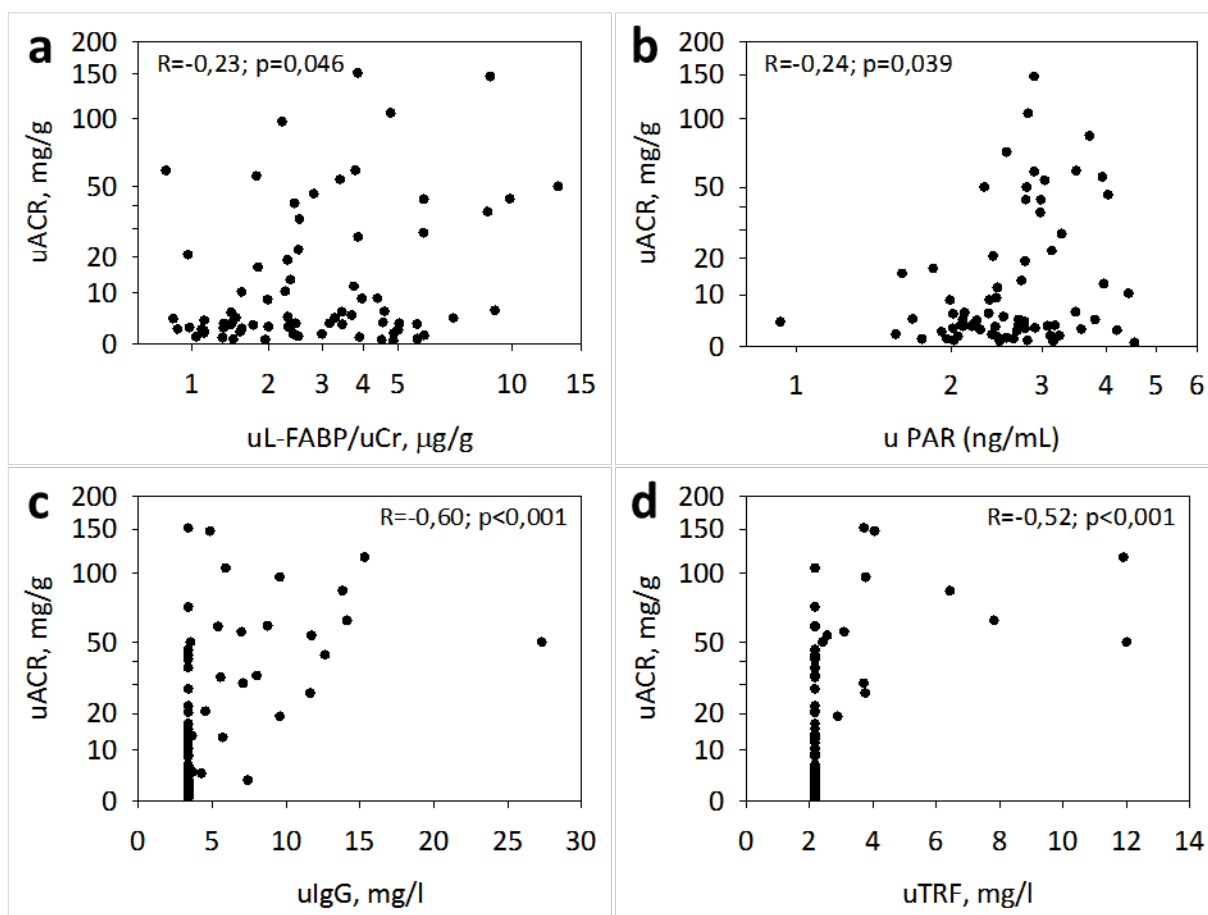
### 5.5. Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z wartością wskaźnika albumina do kreatyniny w pojedynczej porcji moczu (uACR)

Wykazano istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy większością badanych wskaźników uszkodzenia nerek ocenianych w moczu: uNGAL i uNGAL/uCr, uKIM-1 i uKIM-1/uCr, uL-FABP/uCr, uIgG i uTRF, a wartością wskaźnika uACR w pojedynczej porcji moczu. Dodatkowo, obserwowano dodatnią zależność pomiędzy stężeniem uPAR w surowicy, a wielkością uACR. Wymienione zależności ilustrują Ryciny 7 i 8. W przypadku stężeń NGAL i KIM-1 ocenianych w moczu pacjentów obserwowane korelacje były silniejsze po korekcie stężeń wobec stężenia kreatyniny w moczu. W przypadku uL-FABP istotną korelację z uACR obserwowano jedynie dla wskaźnika skorygowanego (uL-FABP/uCr).



### Rycina 7.

Istotnie statystycznie korelacje pomiędzy badanymi markerami uszkodzenia nerek: stężeniem NGAL w moczu (a), wskaźnikiem uNGAL/uCr (b), stężeniem KIM-1 w moczu (c) oraz wskaźnikiem uKIM-1/uCr (d) a wskaźnikiem uACR. Podano współczynniki korelacji rang Spearmana i wartości p. Wartości przedstawiono na skali logarytmicznej ze względu na prawoskośny rozkład zmiennych.



**Rycina 8.**

Istotne statystycznie korelacje pomiędzy badanymi markerami uszkodzenia nerek: wskaźnikiem uL-FABP/uCr (a), stężeniem uPAR w surowicy (b) oraz stężeniami IgG (c) i transferyny w moczu (d) a wskaźnikiem uACR. Podano współczynniki korelacji rang Spearmana i wartości p. Wartości uL-FABP/uCr, uPAR i uACR przedstawiono na skali logarytmicznej ze względu na prawoskośny rozkład zmiennych.

### 5.6. Porównanie pacjentów w zależności od wartości eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>)

Grupę chorych z T2DM podzielono również na 3 podgrupy w zależności od wartości eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>):

- pacjenci, u których wartość eGFR wynosiła >90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>,
- pacjenci, u których wartość eGFR wynosiła od 60 do 90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>,
- pacjenci, u których wartość eGFR wynosiła od 30 do 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

Grupa chorych z eGFR >90 ml/min/1,73m<sup>2</sup> była znamienne młodsza w porównaniu do pozostałych podgrup. Szczegółowe dane demograficzne i kliniczne badanych chorych z T2DM podzielonych na podgrupy w zależności od wartości wskaźnika eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>) przedstawiono w Tabeli 21.

**Tabela 21.**

Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych z T2DM podzielonych na podgrupy w zależności od wartości eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>).

Parametr badany	eGFR, ml/min/1,73m <sup>2</sup>			p
	>90	60-90	30-60	
Wiek, lata	56 (±10)	66 (±9)	72 (±4)	<0,001 <sup>a,b</sup>
Płeć męska, n (%)	28 (45)	17 (43)	10 (67)	0,3
BMI, kg/m <sup>2</sup>	30,9 (±5,8)	32,1 (±5,5)	31,0 (±6,5)	0,5
Czas trwania cukrzycy, lata	5 (2-10)	8 (2-11)	8 (4-10)	0,5
uACR, mg/g	5,6 (2,9-18,7)	4,7 (2,2-43,4)	6,5 (2,7-46,1)	0,9

<sup>a</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica pomiędzy grupą z eGFR>90 a grupą z eGFR 30-60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>; <sup>b</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z eGFR>90 a grupą z eGFR 60-90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>

Ponadto przeanalizowano wyniki badania morfologii krwi obwodowej w odniesieniu do wielkości eGFR, nie stwierdzając istotnych zależności. Porównanie wartości pomiędzy badanymi podgrupami a parametrami morfologii krwi przedstawione są w Tabeli 22.

**Tabela 22.**

Wyniki morfologii krwi obwodowej w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>).

Parametr badany	eGFR, ml/min/1,73m <sup>2</sup>			p
	>90	60-90	30-60	
Hemoglobina, g/dl	13,9 (±1,3)	13,6 (±1,5)	13,6 (±1,2)	0,5
Leukocyty, 10 <sup>3</sup> /μl	7,12 (6,12-9,24)	7,08 (6,45-8,28)	7,13 (6,20-7,74)	0,9
Płytki krwi, 10 <sup>3</sup> /μl	242 (211-282)	228 (198-282)	192 (170-259)	0,09
Neutrofile, %	62,8 (9,7)	60,9 (7,1)	58,8 (11,3)	0,3
Limfocyty, %	25,8 (7,6)	28,6 (7,3)	28,6 (9,8)	0,3
Monocyty, %	6,0 (1,8)	5,9 (1,2)	6,5 (2,2)	0,8

W wyodrębnionych grupach przeanalizowano także wyniki badania ogólnego moczu. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy ilością osób z bakteriurią między grupą z eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>) >90, a grupą z eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>) w zakresie 60-90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Wyniki przedstawiono w tabeli 23.

**Tabela 23.**

Wyniki badania ogólnego moczu w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od wartości wskaźnika eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>).

Parametr badany	eGFR, ml/min/1,73m <sup>2</sup>			p
	>90	60-90	30-60	
Ciężar właściwy moczu	1021 (±6)	1019 (±5)	1019 (±5)	0,4
pH moczu	5,5 (±0,5)	5,4 (±0,4)	5,6 (±0,7)	0,4
Białkomocz, n (%)	2 (3)	1 (3)	1 (7)	0,8
Glukozyuria, n (%)	14 (24)	5 (13)	0	0,06
Erytrocyturia, n (%)	2 (3)	1 (3)	1 (7)	0,8
Bakteriuria, n (%)	1 (2)	6 (15)	1 (7)	0,037 <sup>b</sup>
Leukocyturia, n (%)	8 (14)	5 (13)	3 (20)	0,8

<sup>b</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z eGFR>90 a grupą z eGFR 60-90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>

Wśród badanych chorych przeprowadzono również analizę wyników badań biochemicznych stwierdzając istotną statystycznie różnicę wartości HbA<sub>1c</sub> między grupą, w której wskaźnik eGFR wynosił >90 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a grupą z eGFR 30-60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Wyniki przedstawiono w tabeli 24.



**Tabela 24.**

Porównanie wyników badań biochemicznych w podgrupach wyodrębnionych wśród badanych chorych T2DM w zależności od wartości wskaźnika eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>).

Parametr badany	eGFR, ml/min/1,73m <sup>2</sup>			p
	>90	60-90	30-60	
Glukoza, mmol/l	6,8 (±2,1)	6,6 (±1,0)	5,8 (±1,1)	0,1
CRP, mg/l	3,5 (1,6-6,9)	2,7 (1,3-4,3)	3,0 (0,5-4,2)	0,4
HbA <sub>1c</sub> , %	6,9 (6,0-8,1)	6,3 (5,9-7,5)	6,0 (5,4-6,5)	0,013 <sup>a</sup>
Albumina w moczu, mg/l	6,4 (3,6-15,3)	7,6 (2,2-36,1)	6,5 (2,6-46,1)	0,9
Kreatynina w moczu, mmol/l	8,8 (6,18-13,2)	7,9 (5,3-12,3)	7,1 (3,5-12,3)	0,6
Cholesterol całkowity, mmol/l	4,90 (±1,16)	4,76 (±1,13)	4,45 (±1,06)	0,4
LDL-cholesterol, mmol/l	2,82 (±1,08)	2,69 (±0,93)	2,35 (±0,93)	0,3
HDL-cholesterol, mmol/l	1,29 (±0,30)	1,26 (±0,28)	1,24 (±0,15)	0,9
Trójglicerydy, mmol/l	1,54 (1,1-2,07)	1,53 (1,16-2,28)	1,95 (1,15-2,03)	0,8

<sup>a</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z eGFR>90 a grupą z eGFR 30-60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>

Analizie poddano również wartość wskaźników uszkodzenia nerek w podgrupach wyodrębnionych wśród badanych chorych w zależności od wartości wskaźnika eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>). Stwierdzono, że stężenie uromoduliny w surowicy było istotnie statystycznie wyższe w grupie chorych z eGFR >90 i eGFR 60-90 ml/min/1,73m<sup>2</sup> w porównaniu do grupy z eGFR 30-60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Natomiast stężenie sNGAL w surowicy było istotnie niższe w grupie chorych z eGFR >90 ml/min/1,73m<sup>2</sup> w odniesieniu do grupy, w której eGFR wynosił 30-60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. W badanych grupach porównano również stężenie cystatyny C w surowicy, stwierdzając najniższą wartość w grupie chorych z eGFR>90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. eGFR oszacowany według wzoru CKD-EPI dla cystatyny C miał największą wartość również w grupie chorych z eGFR >90 ml/min/1,73m<sup>2</sup> oszacowanego według wzoru dla kreatyniny. Była to różnica istotna statystycznie w porównaniu do dwóch pozostałych grup. Wyniki przedstawiono w tabeli 25.

**Tabela 25.**

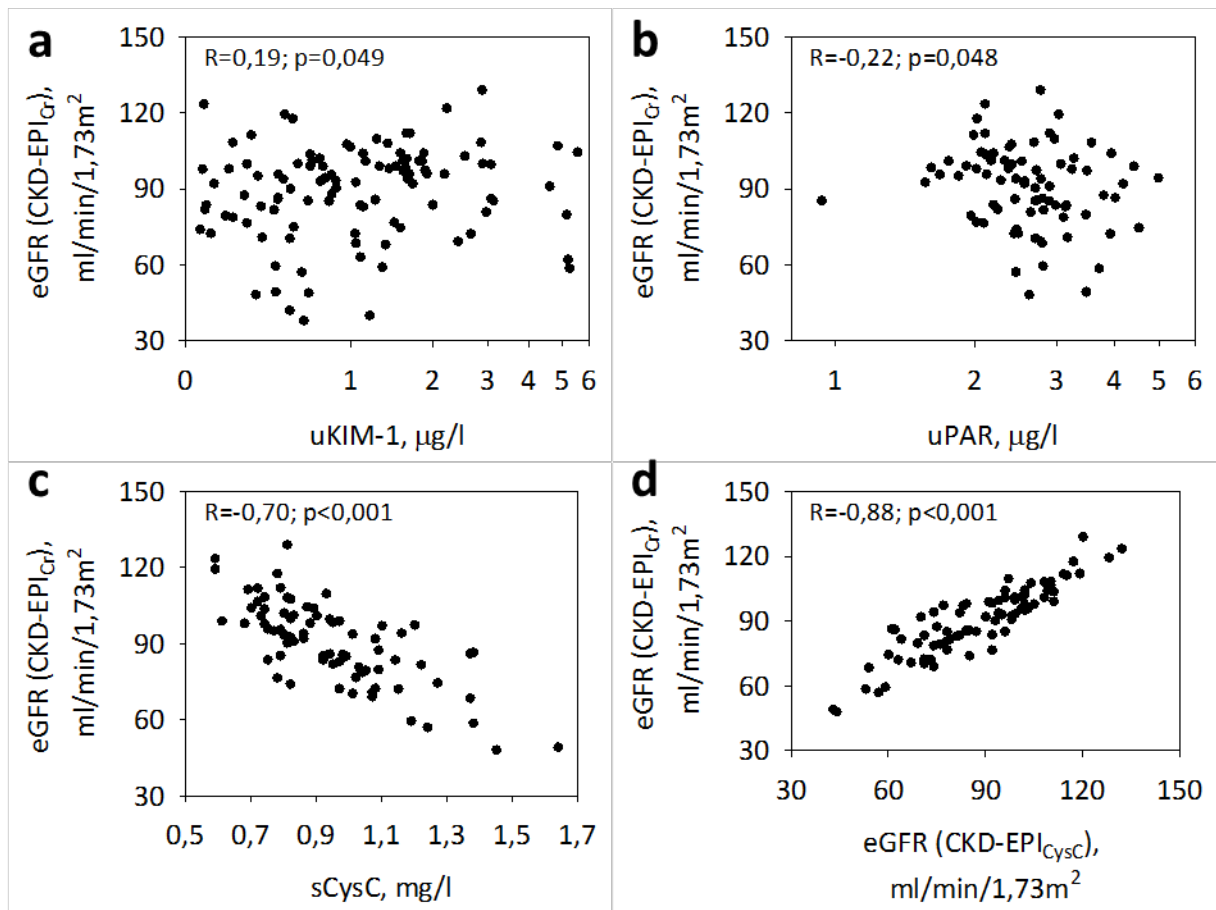
Porównanie wskaźników uszkodzenia nerek w podgrupach wyodrębnionych wśród badanych chorych z T2DM w zależności od wartości wskaźnika eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>)

Parametr badany	eGFR, ml/min/1,73m <sup>2</sup>			p
	>90	60-90	30-60	
uKIM-1, µg/l	1,28 (0,65-1,79)	0,81 (0,34-1,50)	0,60 (0,42-1,18)	0,1
uKIM-1/uCr, µg/g	1,15 (0,75-1,71)	1,17 (0,29-1,31)	1,16 (0,78-1,66)	0,5
uUMOD, mg/l	7,54 (3,88-20,40)	5,87 (2,17-11,19)	11,28 (4,54-13,78)	0,4
uUMOD/uCr, mg/g	10,07 (3,44-20,62)	6,66 (2,36-12,78)	11,86 (7,47-12,32)	0,3
sUMOD, µg/l	141 (103-180)	124 (88-173)	69 (33-106)	0,003 <sup>a,c</sup>
uL-FABP, µg/l	2,33 (1,79-3,01)	2,25 (1,94-2,93)	2,10 (1,94-2,25)	0,8
uL-FABP/uCr, µg/g	2,40 (1,45-3,82)	2,48 (1,97-4,64)	5,03 (2,28-5,89)	0,2
uIgG powyżej progu detekcji, n (%)	14 (24)	12 (33)	1 (10)	0,3
uTRF powyżej progu detekcji, n (%)	7 (12)	7 (19)	1 (10)	0,6
uNGAL, µg/l	13,5 (3,8-30,8)	14,6 (10,6-27,4)	9,0 (5,1-12,0)	0,1
uNGAL/uCr, µg/g	10,0 (4,0-22,2)	15,2 (6,6-36,4)	12,8 (6,8-26,8)	0,3
sNGAL, µg/l	53,3 (42,3-72,0)	60,5 (47,0-69,6)	74,0 (73,3-116,9)	0,049 <sup>a</sup>
sCysC, mg/l	0,81 (0,74-0,88)	1,03 (0,95-1,09)	1,38 (1,24-1,45)	<0,001 <sup>a,b</sup>
eGFR (CKD-EPI <sub>CysC</sub> ), ml/min/1,73m <sup>2</sup>	99 (95-104)	80 (73-85)	49 (47-57)	<0,001 <sup>a,b</sup>
uPAR, µg/l	2,43 (2,10-2,94)	2,78 (2,44-3,13)	2,81 (2,62-3,48)	0,1
sMMP-9, µg/l	1396 (599-2088)	871 (646-998)	1117 (718-1191)	0,8
uβ2M powyżej progu detekcji, n (%)	1 (7)	1 (14)	2 (40)	0,2

<sup>a</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z eGFR>90 a grupą z eGFR 30-60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>; <sup>b</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z eGFR>90 a grupą z eGFR 60-90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>; <sup>c</sup> – w teście *post hoc* istotna różnica między grupą z eGFR 60-90 a grupą z eGFR 30-60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>

### 5.7. Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z wartością wskaźnika filtracji kłębuszkowej (eGFR)

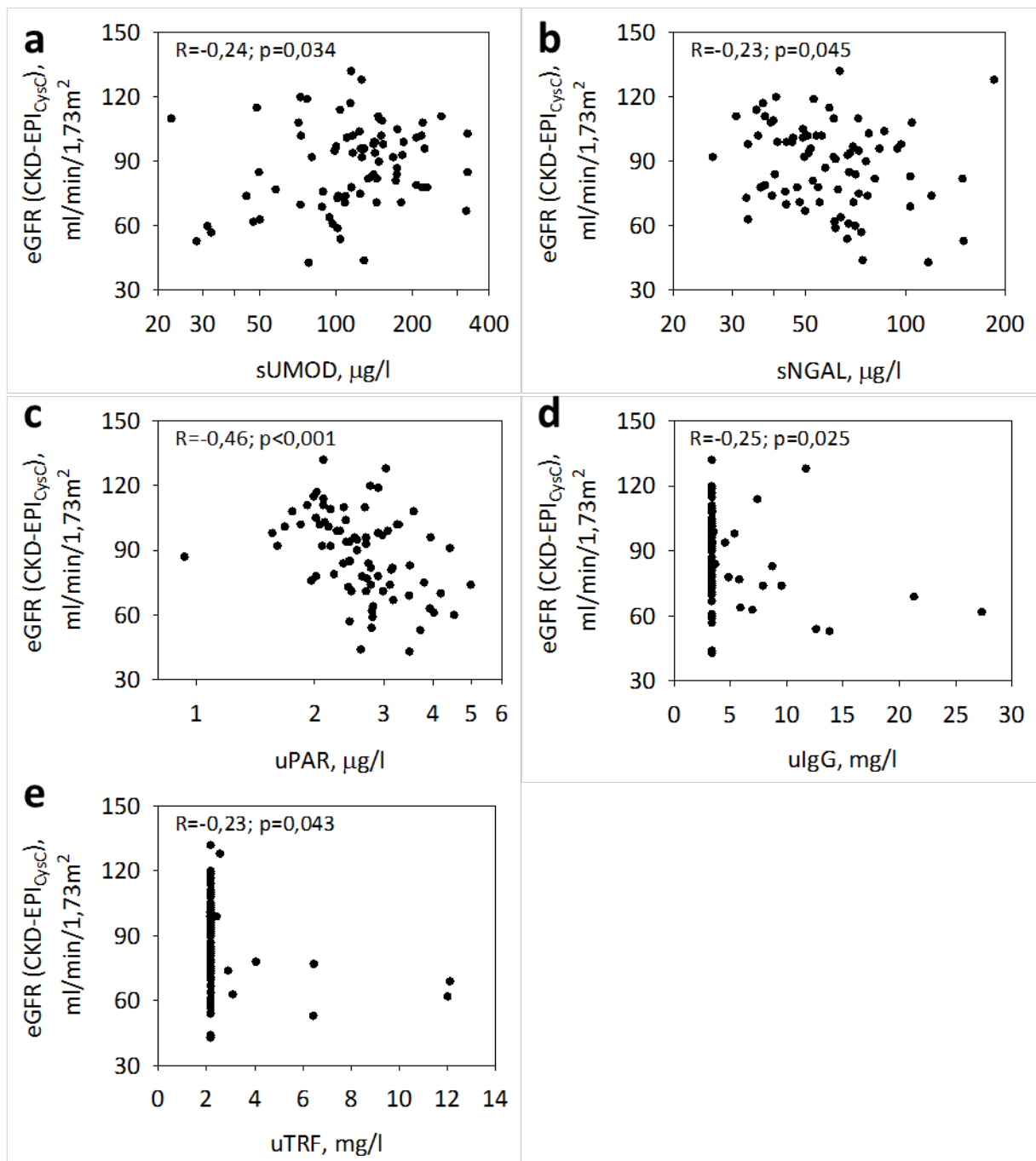
Oceniono korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z eGFR oszacowanym w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy. Spośród wskaźników oznaczanych w moczu, jedynie stężenie uKIM-1 wykazywało słabą dodatnią korelację z eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>). Słabą ujemną korelację z eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>) obserwowano dla stężenia uPAR w surowicy. Stężenie cystatyny C w surowicy i eGFR obliczone w oparciu o stężenie cystatyny C dobrze korelowały z eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>). Opisane zależności ilustruje Rycina 7. Nie wykazano korelacji między pozostałymi badanymi wskaźnikami uszkodzenia nerek, a eGFR wyliczonym w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy.



**Rycina 9.**

Istotnie statystycznie korelacje pomiędzy badanymi markerami uszkodzenia nerek: stężeniami KIM-1 w moczu (a), uPAR (b) i cystatyny C w surowicy (c) oraz eGFR oszacowanym w oparciu o stężenie cystatyny C w surowicy (d) a eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>). Podano współczynniki korelacji rang Spearmana i wartości p. Wartości uKIM-1 i uPAR przedstawiono na skali logarytmicznej ze względu na prawoskośny rozkład zmiennych.

Oceniono także korelacje badanych markerów uszkodzenia nerek ze wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej oszacowanym w oparciu o stężenia cystatyny C w surowicy. Wykazano dodatnią korelację między stężeniem uromoduliny w surowicy a eGFR (CKD-EPI<sub>CysC</sub>). Obserwowano ponadto ujemne korelacje między stężeniami IgG i transferyny w moczu oraz sNGAL i uPAR, a eGFR (CKD-EPI<sub>CysC</sub>) (Rycina 8). Poza korelacją między uPAR a eGFR (CKD-EPI<sub>CysC</sub>) były to słabe zależności. Dodatkowo w przypadku uIgG i uTRF, korelacje należy interpretować ostrożnie ze względu na fakt, że u większości pacjentów stężenia tych białek pozostawały poniżej granicy oznaczalności. Pozostałe badane wskaźniki uszkodzenia nerek nie korelowały z eGFR wyliczonym w oparciu o stężenie cystatyny C w surowicy.



**Rycina 10.**

Istotnie statystycznie korelacje pomiędzy badanymi markerami uszkodzenia nerek: stężeniami UMOD (a), NGAL (b) i uPAR w surowicy (c) oraz stężeniami IgG (d) i transferyny w moczu (e) a eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>). Podano współczynniki korelacji rang Spearmana i wartości p. Wartości sUMOD, sNGAL i uPAR przedstawiono na skali logarytmicznej ze względu na prawoskośny rozkład zmiennych.

### **5.8. Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z wybranymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi (wiekiem, czasem trwania cukrzycy, wartością HbA<sub>1c</sub> oraz stężeniami glukozy, CRP i lipidów w surowicy)**

W badanej grupie chorych z T2DM wykazano dodatnie zależności między stężeniami cystatyny C i uPAR w surowicy a wiekiem pacjentów. Stężenia uromoduliny w surowicy korelowały z kolei ujemnie z wiekiem. Słabą dodatnią korelację z wiekiem pacjentów obserwowano również dla wskaźnika uL-FABP/uCr. Szczegółowe podsumowanie wymienionych zależności przedstawia Tabela 26.

Czas trwania cukrzycy wykazywał jedynie słabą korelację ze stężeniami IgG w moczu ( $R=0,20$ ;  $p=0,045$ ).

Stopień wyrównania cukrzycy określony za pomocą stężenia HbA<sub>1c</sub> korelował dodatnio ze stężeniem NGAL w moczu i wskaźnikiem uNGAL/uCr, wskaźnikiem uKIM-1/uCr, stężeniami IgG i transferyny w moczu oraz uPAR w surowicy (Tabela 26).

Obserwowano ponadto, dodatnią korelację między stężeniem L-FABP w moczu ze stężeniami glukozy w surowicy pacjentów ( $R=0,21$ ;  $p=0,016$ ). Nie wykazano innych korelacji ocenianych wskaźników uszkodzenia nerek z odsetkiem HbA<sub>1c</sub> i stężeniem glukozy na czczo w badanej grupie chorych.

Stężenie CRP u badanych pacjentów z T2DM było dodatnio skorelowane ze stężeniami sNGAL, uPAR i cystatyny C w surowicy, przy czym korelacja z uPAR była najsilniejsza, natomiast korelacja z cystatyną C słaba. Wykazano także słabe, lecz istotne statystycznie dodatnie zależności między stężeniem CRP w surowicy, a stężeniami białek wielkocząsteczkowych (IgG i transferyny) w moczu. Szczegółowe dane dotyczące tych zależności podano w Tabeli 26.

**Tabela 26.**

Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z wiekiem pacjentów z T2DM, stopniem wyrównania cukrzycy wyrażonym stężeniem HbA<sub>1c</sub> oraz nasileniem stanu zapalnego wyrażonym stężeniem CRP.

Parametr badany	Wiek		HbA <sub>1c</sub>		CRP	
	R	p	R	p	R	p
uNGAL	NS		0,25	0,011	NS	
uNGAL/uCr	NS		0,26	0,012	NS	
sNGAL	NS		NS		0,46	<0,001
uKIM-1/uCr	NS		0,24	0,023	NS	
sUMOD	-0,30	0,002	NS		NS	
uL-FABP/uCr	0,25	0,034	NS		NS	
uIgG	NS		0,36	<0,001	0,24	0,021
uTRF	NS		0,31	0,002	0,22	0,042
sCysC	0,59	<0,001	NS		0,25	0,046
uPAR	0,25	0,030	0,24	0,042	0,58	<0,001

NS – wyniki nieistotne statystyczne

Żaden z badanych wskaźników uszkodzenia nerek nie korelował istotnie statystycznie ze stężeniem cholesterolu całkowitego. Obserwowano natomiast szereg znamiennych korelacji między badanymi markerami uszkodzenia nerek a stężeniami cholesterolu LDL, HDL i trójglicerydów w surowicy pacjentów. Stężenie LDL-cholesterolu wykazywało słabą ujemną korelację z uKIM1/uCr i słabą dodatnią korelację z sUMOD. Stężenie HDL-cholesterolu korelowało ujemnie ze stężeniami sNGAL, uPAR i cystatyny C w surowicy oraz L-FABP w moczu. Stężenie trójglicerydów korelowało ujemnie ze stężeniami uromoduliny w surowicy i moczu oraz L-FABP w moczu, natomiast dodatnią zależność obserwowano dla trójglicerydów i uPAR w surowicy. Szczegółowe dane dotyczące tych zależności przedstawiono w Tabeli 27.

**Tabela 27.**

Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek ze stężeniami cholesterolu LDL, HDL i trójglicerydów w surowicy pacjentów z T2DM.

Parametr badany	LDL-cholesterol		HDL-cholesterol		Trójglicerydy	
	R	p	R	p	R	p
sNGAL	NS		-0,26	0,022	NS	
uKIM-1/uCr	-0,20	0,048	NS		NS	
uUMOD	NS		NS		-0,26	0,010
sUMOD	0,20	0,049	NS		-0,23	0,022
uL-FABP	NS		-0,25	0,031	-0,30	0,011
sCysC	NS		-0,25	0,029	NS	
uPAR	NS		-0,28	0,014	0,27	0,019

NS – wyniki nieistotne statystyczne

### 5.9. Wzajemne korelacje między badanymi wskaźnikami uszkodzenia nerek

W badanej grupie chorych z T2DM wykazano szereg korelacji pomiędzy badanymi wskaźnikami uszkodzenia nerek, zależności te przedstawiono w Tabeli 28. Stężenia białek wielkocząsteczkowych, tj. IgG i transferyny w moczu korelowały dodatnio ze sobą nawzajem, ze stężeniami uNGAL i uKIM-1 w moczu (także po ich korekcje wobec stężenia kreatyniny w moczu) oraz ze stężeniami cystatyny C i uPAR w surowicy. Stężenia cystatyny C i uPAR w surowicy były dość silnie dodatnio skorelowane. Ponadto, stężenia cystatyny C i uPAR w surowicy korelowały dodatnio ze stężeniami sNGAL w surowicy i moczu, a także ze wskaźnikiem uNGAL/uCr. Ujemne zależności obserwowano między stężeniem uromoduliny w surowicy a sCysC oraz między stężeniem uromoduliny w moczu a uPAR. Współczynnik uL-FABP/uCr korelował dodatnio ze współczynnikami uNGAL/uCr i uKIM-1/uCr, jednak wydaje się, że jest to związane z wykorzystaniem stężeń kreatyniny w moczu do obliczenia wszystkich wymienionych współczynników, ponieważ nie obserwowano korelacji uL-FABP z uNGAL i uKIM-1, a wykazana korelacja uL-FABP/uCr z uKIM-1 była ujemna. Obserwowano natomiast słabą dodatnią korelację między współczynnikiem uL-FABP/uCr i stężeniem cystatyny C w surowicy.

Nie obserwowano istotnych statystycznie zależności między stężeniami MMP-9 w surowicy oraz  $\beta$ 2-mikroglobuliny i L-FABP w moczu a pozostałymi badanymi markerami.



**Tabela 28.**

Istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) wzajemne korelacje między badanymi wskaźnikami uszkodzenia nerek. Podano współczynniki korelacji rang Spearmana.

Parametr badany	uUMOD	uL-FABP/uCr	uIgG	uTRF	sCysC	uPAR
uNGAL	NS	NS	0,36	0,25	0,25	0,23
uNGAL/uCr	NS	0,33	0,31	0,23	0,26	0,32
uKIM-1	0,29	-0,28	0,40	0,32	NS	NS
uKIM-1/uCr	NS	0,23	0,42	0,34	NS	NS
uUMOD	-	NS	NS	NS	NS	-0,26
sUMOD	NS	NS	NS	NS	-0,29	NS
uL-FABP/uCr	NS	-	NS	NS	0,25	NS
uIgG	NS	NS	-	0,69	0,33	0,30
uTRF	NS	NS	0,69	-	0,26	0,24
sNGAL	NS	NS	NS	NS	0,29	0,45
sCysC	NS	0,25	0,33	0,26	-	0,53

NS – wyniki nieistotne statystyczne

#### **5.10. Ocena związku stosowanego leczenia z wartościami badanych wskaźników uszkodzenia nerek w grupie pacjentów z T2DM**

Nie zaobserwowano różnic dotyczących poziomów badanych wskaźników uszkodzenia nerek między pacjentami przyjmującymi statyny lub leki blokujące układ renina-angiotensyna-aldosteron w porównaniu z chorymi nieleczonymi wymienionymi lekami.

Istotne statystycznie różnice wykazano natomiast między grupą chorych z T2DM leczonych wyłącznie doustnymi lekami hipoglikemizującymi a grupą chorych wymagających podawania insuliny. Stężenie uromoduliny w moczu oraz wartości wskaźnika uUMOD/uCr były wyraźnie niższe w grupie chorych leczonych insulina (Tabela 29).

**Tabela 29.**

Istotnie statystycznie różnice dotyczące ocenianych wskaźników uszkodzenia nerek w grupie chorych z T2DM leczonych doustnymi lekami hipoglikemizującymi i wymagających leczenia insuliną

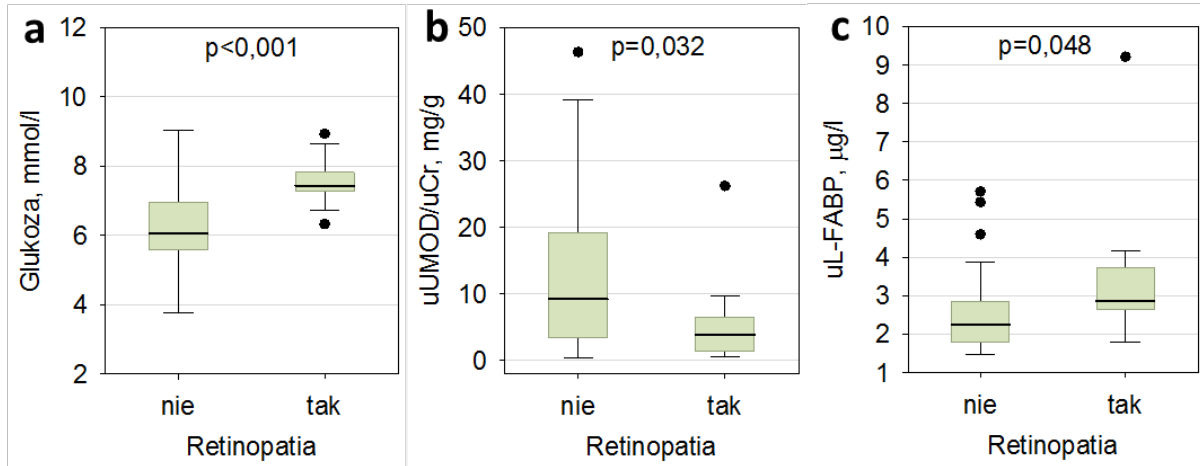
Parametr badany	Chorzy nieleczeni insuliną	Chorzy leczeni insuliną	p
uUMOD, mg/l	7,74 (3,88-20,41)	4,88 (2,19-8,45)	0,026
uUMOD/uCr, mg/g	10,85 (4,32-21,89)	5,27 (1,47-10,02)	0,003

### **5.11. Porównanie pacjentów w zależności od obecności retinopatii i powikłań sercowo-naczyniowych**

Dane dotyczące powikłań cukrzycy w badanej grupie chorych z T2DM zgromadzono w Tabeli 5 (Rozdział 5.1).

Spośród 85 pacjentów, dla których były dostępne dane z badania okulistycznego, retinopatię cukrzycową zdiagnozowano u 14 (16%). Chorzy ze zdiagnozowaną retinopatią cukrzycową charakteryzowali się w wyższymi stężeniami glukozy na czczo w porównaniu do pacjentów bez retinopatii. Wiek, czas trwania cukrzycy oraz wyniki podstawowych badań biochemicznych, w tym HbA<sub>1c</sub> i CRP nie różniły się istotnie statystycznie między grupami chorych z i bez retinopatii.

Wśród badanych markerów uszkodzenia nerek związek z rozpoznaniem retinopatii wykazano jedynie dla wskaźnika uUMOD/uCr (obserwowano niższe wartości u chorych z retinopatią) i stężeń L-FABP w moczu (obserwowano wyższe stężenia u chorych z retinopatią). Różnice te przedstawiono na Rycinie 11.



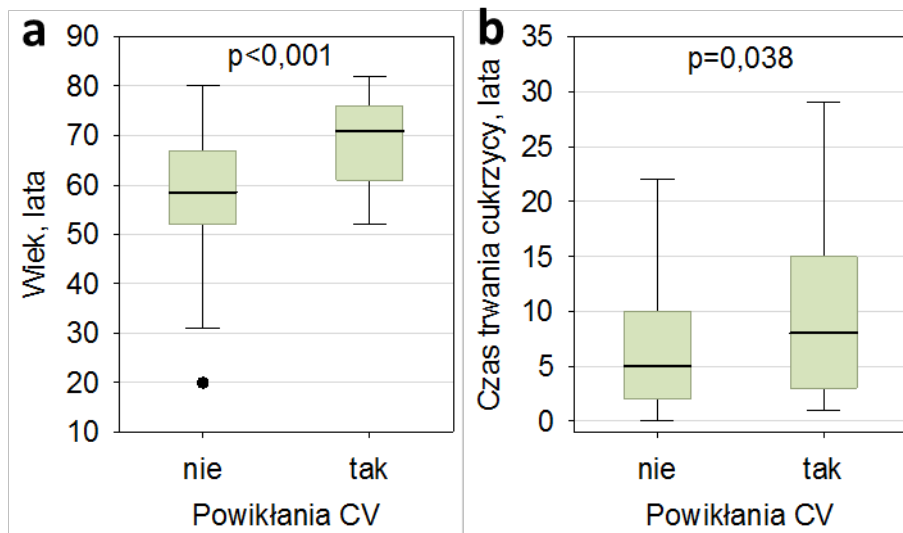
### Rycina 11.

Istotnie statystycznie różnice między chorymi z rozpoznaną retinopatią cukrzycową a chorymi bez retinopatii dotyczące glikemii (a), wskaźnika uMOD/uCr (b) oraz stężeń L-FABP w moczu (c). Dane na rycinach przedstawiono jako medianę, zakres międzykwartyłowy (ramka), zakres wartości nieodstających (wąsy) i wartości odstające (punkty).

W badanej grupie 117 chorych z T2DM, co najmniej jedno powikłanie sercowo-naczyniowe zdiagnozowano u 39 osób (33%), w tym chorobę niedokrwioną serca u 19 (16%), miażdżycę uogólnioną u 19 (16%) i niewydolność serca u 5 (4%). Dwunastu pacjentów (10%) przeżyło ostry zespół wieńcowy, a cztery (3%) osoby udar lub przejściowy napad niedokrwionny (Tabela 5).

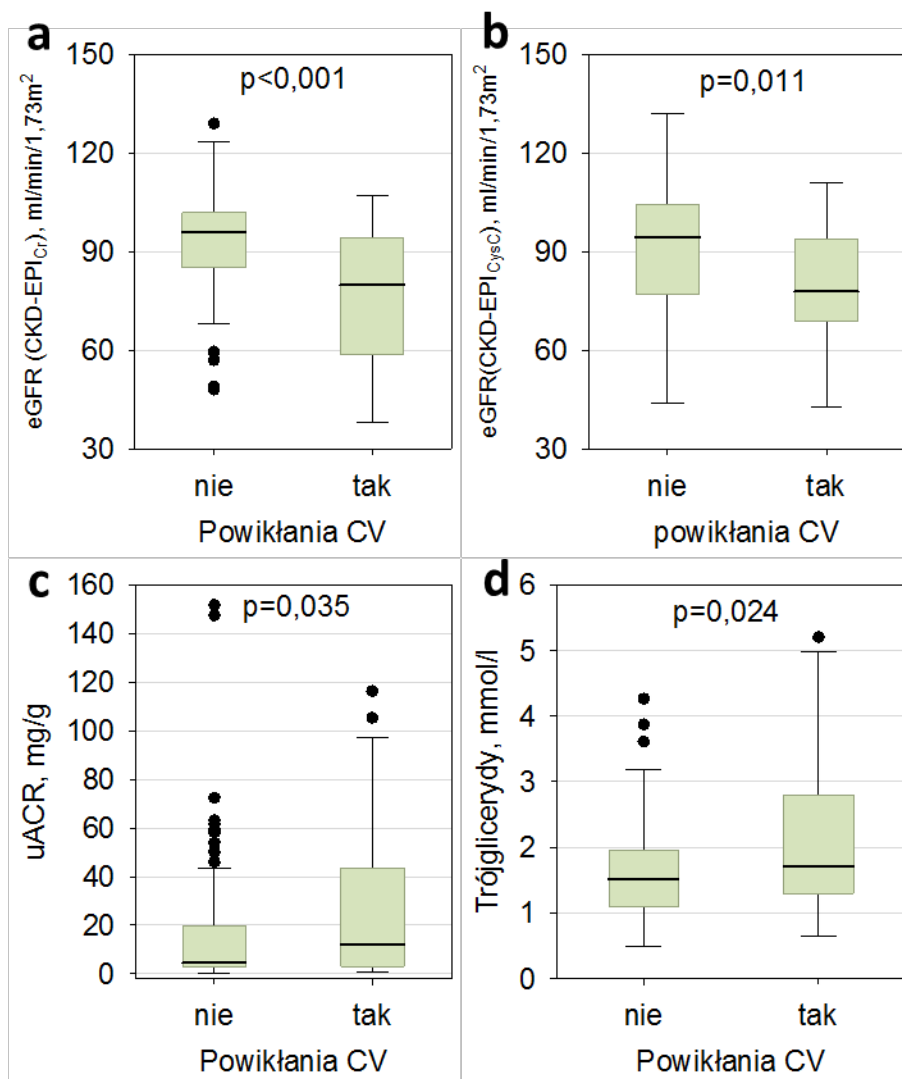
Przeanalizowano różnice między pacjentami ze zdiagnozowanymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi, a pacjentami bez rozpoznanych chorób sercowo-naczyniowych. Pacjenci z powikłaniami sercowo-naczyniowymi byli starsi, a czas trwania cukrzycy był u nich dłuższy (Rycina 12). Obecność powikłań sercowo-naczyniowych wiązała się z wyższymi stężeniami trójglicerydów w surowicy (Rycina 13). Rozpoznanie choroby sercowo-naczyniowej wiązało się z wyższymi wartościami wskaźnika uACR oraz z niższymi wartościami eGFR szacowanymi zarówno w oparciu o stężenia kreatyniny, jak i cystatyny C w surowicy (Rycina 13).

Wśród badanych wskaźników uszkodzenia nerek istotne różnice między chorymi z i bez rozpoznania chorób sercowo-naczyniowych wykazywały wartości wskaźnika uKIM-1/uCr oraz stężenia uPAR i cystatyny C w surowicy, które były wyższe u pacjentów z rozpoznaniem choroby sercowo-naczyniowej (Rycina 14). Z kolei stężenie uromoduliny w surowicy było nieznacznie niższe u chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowymi.



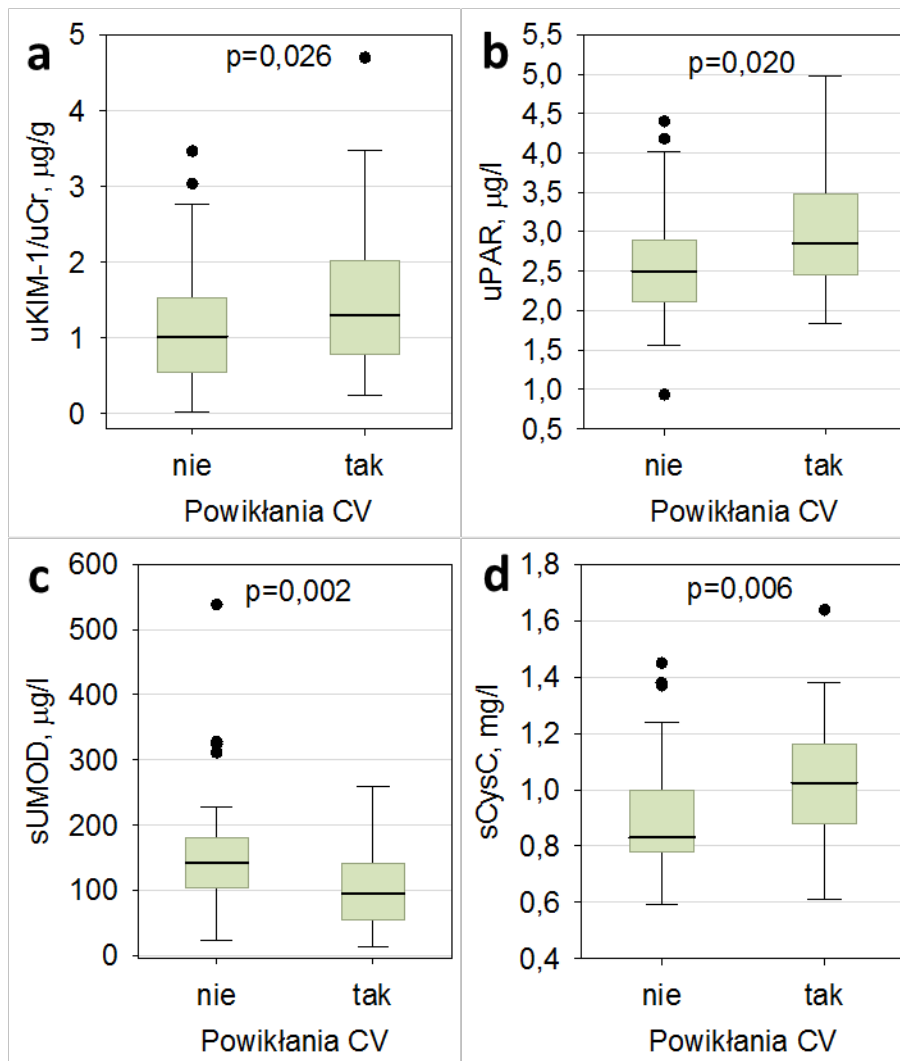
**Rycina 12.**

Istotne statystycznie różnice między chorymi z rozpoznanymi chorobami sercowo-naczyniowymi (CV) a chorymi bez powikłań sercowo-naczyniowych dotyczące wieku (a) i czasu trwania cukrzycy (b). Dane na rycinach przedstawiono jako medianę, zakres międzykwartylowy (ramka), zakres wartości nieodstających (wąsy) i wartości odstające (punkty).



**Rycina 13.**

Istotne statystycznie różnice między chorymi z rozpoznanymi chorobami sercowo-naczyniowymi (CV) a chorymi bez powikłań sercowo-naczyniowych dotyczące wskaźnika filtracji kłębuszkowej oszacowanego w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy (a) i stężenie cystatyny C w surowicy (b), wskaźnika uACR (c) oraz stężenia trójglicerydów w surowicy (d). Dane na rycinach przedstawiono jako medianę, zakres międzykwartyłowy (ramka), zakres wartości nieodstających (wąsy) i wartości odstające (punkty).



**Rycina 14.**

Istotnie statystycznie różnice między chorymi z rozpoznanymi chorobami sercowo-naczyniowymi (CV) a chorymi bez powikłań sercowo-naczyniowych dotyczące stężenia NGAL w moczu (a), wskaźnika uKIM-1/uCr (b) oraz stężeń uPAR (c), uromoduliny (d) i cystatyny C w surowicy (e). Dane na rycinach przedstawiono jako medianę, zakres międzykwartylowy (ramka), zakres wartości nieodstających (wąsy) i wartości odstające (punkty).

## 6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

### 6.1. Podsumowanie wyników

Badaniem objęto łącznie 117 dorosłych chorych z T2DM, dobrze kontrolowaną ( $HbA_{1c} \leq 7\%$ ) u ok. 60% pacjentów oraz z typowymi dla tej grupy chorobami współistniejącymi (nadciśnienie, choroba niedokrwienna serca). U zdecydowanej większości badanych (98%), wielkość wskaźnika eGFR mieściła się  $>45$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>, natomiast wartość uACR  $<30$  mg/g obserwowano u prawie 80% chorych. Mediana czasu od rozpoznania T2DM dla grupy wynosiła 6 lat, jedynie 12% chorych stanowili pacjenci ze świeżo wykrytą cukrzycą.

U wszystkich pacjentów oceniono nasilenie albuminurii metodą immunoturbidymetryczną oraz charakter białkomoczu za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Dodatkowo, oznaczono stężenia wybranych białek specyficznych w moczu: uNGAL, uKIM-1, uIgG, uTRF, uL-FABP, uUMOD, u $\beta$ 2M oraz w surowicy: sCysC, sUMOD, uPAR, sMMP-9. U blisko 1/5 chorych w rozdiale elektroforetycznym białek moczu nie wykryto obecności białka, a u ok. 62% badanych obserwowano jedynie śladową obecność albuminy, natomiast białkomocz kłębuszkowy lub kłębuszkowo-cewkowy zdiagnozowano u 18% chorych. W badanej grupie nie obserwowano typowych białkomoczy cewkowych.

Wyniki elektroforezy białek moczu były dobrze skorelowane z oceną albuminurii tj. ze stężeniem albuminy w moczu i wartością uACR, chociaż w przypadku pojedynczych pacjentów nie uniknięto drobnych rozbieżności w ocenie białkomoczu w oparciu o zastosowane metody. W toku badania wykazano szereg interesujących związków między nasileniem albuminurii i białkomoczu, a stężeniami białek specyficznych mierzonych w moczu chorych (uKIM-1, uNGAL, uIgG i uTRF, słabsze związki z uUMOD i uL-FABP). Dodatkowo, obserwowano dodatnie korelacje między uACR, a stężeniem sCysC i uPAR w surowicy chorych. W ocenie wyników elektroforezy białek moczu zwrócono uwagę na obecność prążka uromoduliny (białka Tamma-Horsfalla) u ok. 1/3 badanych pacjentów, najczęściej ze śladową albuminurią. W tej podgrupie pacjentów obserwowano także wyższe stężenia uUMOD mierzone metodą immunoenzymatyczną. Chorzy ci charakteryzowali się wyższymi stężeniami sUMOD oraz niższymi stężeniami sNGAL i uPAR w surowicy oraz niższymi stężeniami białek specyficznych w moczu (uIgG, uKIM-1 i uL-FABP po korekcji na stężenie kreatyniny w moczu).

W podgrupach pacjentów wyodrębnionych w oparciu o rutynowo stosowaną ocenę wyliczania eGFR opartą o stężenie kreatyniny w surowicy obserwowano różnice dotyczące stężeń sUMOD i sCysC, natomiast nie wykazano różnic dotyczących stężeń białek specyficznych w moczu. Jedynie stężenia uKIM-1 korelowały ujemnie z wielkością eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>). Nie wykazano związku między uACR i rodzajem białkomoczu w elektroforezie a eGFR wg. CKD-EPI<sub>Cr</sub>, natomiast obserwowano ujemną korelację między uACR a eGFR oszacowanym na podstawie stężenia cystatyny C. Wykazano też ujemne korelacje eGFR (CKD-EPI<sub>CysC</sub>) z uIgG i uTRF oraz sUMOD, uPAR i sNGAL.

W badanej grupie obserwowano jedynie nieliczne związki ocenianych markerów biochemicznych z wiekiem chorych (sCysC, sUMOD, uPAR i uL-FABP) i czasem trwania cukrzycy (uIgG). Wykazano ważne zależności między stopniem wyrównania cukrzycy a rodzajem białkomoczu w ocenie elektroforetycznej, eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>), stężeniem uPAR w surowicy i stężeniami białek w moczu: uNGAL, uKIM-1, uIgG i uTRF. Stężenia sCysC, uPAR i sNGAL w surowicy oraz uIgG i uTRF w moczu skorelowane były ze stężeniem CRP w surowicy, przy czym należy zaznaczyć, że u badanych pacjentów nie obserwowano nasilonej odpowiedzi zapalnej organizmu (mediana CRP wynosiła 3 mg/l). Wykazano natomiast, szereg korelacji badanych białek specyficznych (sCysC, uPAR, sUMOD i sNGAL w surowicy; uKIM-1, uUMOD i uL-FABP w moczu) z nasileniem dyslipidemii.

Oceniono związki między wynikami badań laboratoryjnych, a obecnością powikłań cukrzycy tj.: retinopatii i powikłań sercowo-naczyniowych. Grupa chorych ze zdiagnozowaną retinopatią była mało liczna (jedynie 14 osób), jednak wykazano u tych chorych wyższe stężenia uL-FABP i wyższe wartości uUMOD/uCr w porównaniu do pacjentów bez retinopatii. Chorzy z powikłaniami sercowo-naczyniowymi byli również starsi w porównaniu do osób bez takich powikłań, a czas trwania cukrzycy był u nich dłuższy. W tej grupie obserwowano także niższe wartości eGFR (szacowanego zarówno w oparciu o stężenia kreatyniny, jak i cystatyny C), wyższe wartości uACR, wyższe stężenia trójglicerydów, uPAR i sUMOD w surowicy oraz wyższe wartości wskaźnika uKIM-1/uCr w moczu.

## **6.2. Fenotypy uszkodzenia nerek w cukrzycy**

Konstelacja zmian strukturalnych w obrębie nerek obserwowana w przebiegu cukrzycy jest bardzo charakterystyczna, jednak poszczególne jej elementy, które składają się na obraz histopatologiczny CChN mogą również występować pojedynczo w innych schorzeniach. W przebiegu T1DM stwierdza się m.in. pogrubienie błony podstawnej kłębuszków nerkowych oraz ekspansję mezangium. Zmiany morfologiczne obejmują również



cewki, śródmiąższ oraz tętniczki nerkowe. Klasyfikacją histopatologiczną, która służy do oceny zmian strukturalnych w CChN, jest klasyfikacja Tervaerta [3]. Jest ona jednak skoncentrowana na określeniu nieprawidłowości dotyczących kłębuszków nerkowych. Wydaje się więc, że bardziej użyteczny klinicznie podział uszkodzeń obserwowanych w przebiegu CChN zaproponował Fioretto i wsp. [67]. Do swojego badania zakwalifikował 34 chorych z prawidłową funkcją filtracyjną nerek (eGFR w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy  $101 \pm 27$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>) oraz zwiększonym wydalaniem albuminy z moczem. Na podstawie uzyskanych wyników badania histopatologicznego, Fioretto i wsp. [67] podzielili chorych na 3 grupy: (1) z prawidłowym obrazem lub tylko niewielkimi nieprawidłowościami strukturalnymi w obrębie kłębuszka nerkowego oraz śródmiąższu (29,4% badanych), (2) chorych ze zmianami głównie dotyczącymi kłębuszków, typowymi dla CChN (29,4 %) oraz grupę (3), u której uszkodzenie nerek uznano za atypowe, tzn. obserwowano prawidłowy kłębuszek nerkowy lub tylko niewielkie uszkodzenie, natomiast stwierdzano istotne nieprawidłowości dotyczące pozostałych struktur, w zakresie: a) cewek w postaci ich atrofii lub pogrubienia błony podstawnej lub zwłóknienia śródmiąższu; b) tętniczek nerkowych – zaawansowana hialinoza związana ze zmianami miażdżycowymi w obrębie dużych naczyń lub całkowita sklerotyzacja kłębuszka bez zmian w obrębie mezangium . Grupa ta stanowiła blisko 41,2% badanych.

W badaniu Fioretto i wsp. [67] grupa (1), w której nie stwierdzano zmian strukturalnych, składała się z chorych najmłodszych, z najkrócej trwającą cukrzycą oraz z prawidłową funkcją filtracyjną nerek (eGFR 111 ml/min/m<sup>2</sup>), jednak ze zwiększonym wydalaniem albuminy. Z kolei pacjenci, u których w badaniu histopatologicznym nerki stwierdzano zmiany typowe dla CChN (2) byli starsi od chorych z pozostałych grup, najdłużej chorowali na cukrzycę, mieli niższą wartość wskaźnika eGFR oraz największą utratę albuminy z moczem. Chorzy z grupy (3) charakteryzowali się najmniejszym AER i prawidłową funkcją filtracyjną.

Zestawienie uzyskanych w pracy wyników własnych autorki dotyczących grup chorych wyodrębnionych na podstawie badania elektroforezy białek moczu z wynikami badania Fioretto i wsp. [67] pozwala przypuszczać, że podział chorych wg rodzaju białkomoczu częściowo odzwierciedla obraz histopatologiczny uzyskany w trakcie biopsji nerek pacjentów z T2DM. Odpowiednio, wyznaczone przez autorkę grupy: BB i A odpowiadają grupie (1) wg. Fioretto i wsp. [67], natomiast grupa K odpowiada grupie (2). W oparciu o uzyskane w pracy wyniki badania elektroforezy oraz stężenia białek specyficznych oznaczanych w moczu nie wskazano natomiast chorych, których wyniki

pozwołyby na wykazanie ciężkiego uszkodzenia śródmiąższu bez zmian w obrębie kłębuszków nerkowych, obserwowanych w grupie (3) wg. Fioretto i wsp. [67]. Jedym z wyjaśnień może być fakt, że wymienione powyżej zmiany wykazane w badaniu Fioretto i wsp. [67] były obserwowane u chorych ze znacznie niewyrównaną cukrzycą ( $HbA_{1c}$   $8,5 \pm 1,3$ ) podczas, gdy grupa badana przez autorkę pracy charakteryzowała się w większości dobrym wyrównaniem cukrzycy. Prawdopodobne rozbieżności między wynikami autorki i pracą Fioretto i wsp. [67] można również próbować wyjaśnić tym, że uszkodzeniu śródmiąższu wykrywanemu u chorych z T2DM (grupa (3) wg. Fioretto i wsp.) nie zawsze towarzyszył białkomocz drobnocząsteczkowy lub wydalanie z moczem białek specyficznych charakterystycznych dla uszkodzenia cewek. Fioretto i wsp. [67] nie oceniali wydalania z moczem białek drobnocząsteczkowych, nie wiadomo więc, w jakim stopniu drobnocząsteczkowy (cewkowy) białkomocz towarzyszył opisywanym przez nich zmianom histopatologicznym.

Posługując się klasyfikacją Tervaerta [3] oraz podziałem dokonany przez Fioretto i wsp. [67], grupa badaczy Yamanouchi i wsp. [68] dokonała retrospektywnej analizy wyników badania histopatologicznego biopsji nerek u chorych z T2DM czerpiąc dane z krajowego rejestru biopsji. Yamanouchi i wsp. [68] oddzielenie oceniali uszkodzenie kłębuszków, śródmiąższu (IFTA), nasilenie procesu zapalnego oraz rodzaj uszkodzenia naczyń krwionośnych (hialinoza arterioli oraz zmiany arteriosklerotyczne). Zakwalifikowani do badania chorzy z eGFR poniżej  $>60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> zostali podzieleni na dwie grupy: bez białkomoczem (uACR  $<300$  mg/g; grupa liczyła 82 osoby, z czego u 63 obserwowano umiarkowanie zwiększone wydalanie albuminy) oraz pacjentów z białkomoczem (uACR  $>300$  mg/g). W badaniu Yamanouchi i wsp. [68] 62% chorych bez białkomoczem należało do kategorii (1) wg kryteriów zaproponowanych przez Fioretto i wsp. [67], natomiast wśród osób z białkomoczem było to 17% chorych. W grupie z białkomoczem dominowało uszkodzenie typowe dla CChN – opisano je w 66% przypadków. Co istotne, w grupie chorych bez białkomoczem (53% pacjentów) i z niewielkim uszkodzeniem struktur kłębuszka dominowało niewielkie uszkodzenie śródmiąższu pod postacią zwłóknienia i atrofii cewek (IFTA 1), natomiast w grupie z jawnym białkomoczem można było zaobserwować większy odsetek chorych z bardziej zaawansowanymi zmianami śródmiąższu (IFTA 2 u 23 vs. 37%; IFTA 3 u 13 vs. 37% tych chorych) [68].

W przeprowadzonym przez autorkę badaniu białkomocz drobnocząsteczkowy wykrywany w elektroforezie białek moczu towarzyszył białkomoczowi kłębuszkowemu, nie obserwowano przypadków białkomoczem cewkowego bez jednoczesnego białkomoczem

kłębuszkowego. Wydalanie z moczem białek specyficznych charakterystycznych dla uszkodzenia cewek nerkowych (uNGAL, uKIM-1) towarzyszyło zwiększonej albuminurii oraz zwiększonemu wydalaniu IgG i transferyny, sugerując, że uszkodzenie cewek towarzyszy w T2DM uszkodzeniu kłębuszków nerkowych. Analiza wyników histopatologicznych dokonana przez Yamanouchi i wsp. [68] znajduje dobre odzwierciedlenie w wynikach uzyskanych przez autorkę pracy. Stwierdzono wyższe stężenie białek specyficznych będących wskaźnikami uszkodzenia cewek w grupach pacjentów, u których obserwowano zwiększone wydalanie albuminy oraz bardziej zaawansowane uszkodzenie bariery filtracyjnej kłębuszka. Wyniki Yamanouchi i wsp. [68] lepiej współgrają w wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy w porównaniu do opisywanego raportu Fioretto i wsp. [67].

### **6.3. Związek między wielkością albuminurii i rodzajem białkomoczu a stężeniami badanych białek specyficznych**

W oparciu o wnioski zawarte w pracach Fioretto i wsp. [67] oraz Yamanouchi i wsp. [68], w ciągu ostatnich lat w patogenezie CChN zaczęto również uwzględniać uszkodzenie cewek. Rola cewki proksymalnej, związana z jej zaangażowaniem w odpowiedź zapalną i proces zwłóknienia toczące się w śródmiaższu, po raz pierwszy opisane zostały w pracy Zoja i wsp. [69], którzy wykazali, że białka surowicy przefitrowane w kłębuszku aktywowały wydzielanie endoteliny-1 w tej części nefronu. W przypadku cukrzycy do głównych czynników odpowiedzialnych za uszkodzenia cewek należą zaawansowane produkty glikacji białek oraz hiperglikemia. Glikowana albumina poprzez zwiększoną ekspresję genu p65 i nasiloną ekspresję czynnika jądrowego NFkB, a także aktywację szlaków sygnałowych, między innymi kinazy MAP, prowadzi do uwalniania cytokin prozapalnych (w tym interleukiny 8), a także zwiększonej ekspresji molekuł adhezyjnych, m.in. cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1), co powoduje nacieki śródmiaższu przez komórki zapalne [69]. Kolejnym czynnikiem uszkadzającym cewki jest hiperglikemia. W przeprowadzonych eksperymentach *in vitro* wykazano, że ekspozycja komórek cewki proksymalnej na zwiększone stężenie glukozy powoduje zwiększoną ekspresję substancji, które prowadzą do uruchomienia odpowiedzi zapalnej (interleukina 6, CCL2 – *CC chemokine ligand 2*), nasilenia procesu włóknienia (TGF- $\beta$  – transformujący czynnik wzrostu beta) oraz angiogenezy (VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu) [70].

Uszkodzenie cewki proksymalnej, związane z upośledzonym usuwaniem białek przesączonych w kłębuszku z moczu pierwotnego, może również odgrywać rolę w patogenezie albuminurii. Zostało to zauważone pod koniec lat 80. XX wieku dzięki

obserwacjom klinicznym prowadzonych u pacjentów z T1DM o stosunkowo krótkim okresie przebiegu choroby [71]. W powyższym badaniu wykazano zależności pomiędzy nasileniem wydalania albuminy a markerami uszkodzenia cewek. Na podstawie tego odkrycia stworzono wiele modeli zwierzęcych mających na celu wyjaśnienie mechanizmu leżącego u podstaw uszkodzenia cewek. Tojo i wsp. [72] wykazali, że u szczurów z cukrzycą wywołaną streptozotocyną obserwuje się mniejsze wchłanianie zwrotne albuminy w cewkach proksymalnych w porównaniu z grupą kontrolną. Można to częściowo wyjaśnić zmniejszoną endocytozą albuminy spowodowaną zmniejszoną ekspresją megaliny. W kolejnych badaniach nie potwierdzono już znaczącej różnicy w wielkości współczynnika przepuszczalności kłębuszkowej między szczurami z cukrzycą, a szczurami z grupy kontrolnej, stąd nadmierne wydalanie albuminy z moczem przypisano defektowi cewki proksymalnej.

Ciekawym podejściem było badanie przeprowadzone przez Russo i wsp. [73], które dostarczyło nowych informacji na temat udziału cewki proksymalnej w wydalaniu albuminy z moczem. W swojej pracy Russo i wsp. [73] wykazali znacznie wyższą wartość tzw. współczynnika przesiewu kłębuszkowego albuminy (*glomerular-sieving coefficient; GSC*) dla albuminy u szczurów (0,034), u których nie obserwowano białkomoczu. Russo i wsp. [73] stwierdzili również, że duża ilość filtrowanej albuminy została poddana procesowi szybkiego odzyskiwania przez mechanizm transcytozy, natomiast niewielka część albuminy wykazującej zmiany strukturalne została przetransportowana do lizosomów, gdzie zgodnie z klasycznym modelem była rozkładana do reszt aminokwasowych i w takiej postaci wracała do krążenia. Jak wykazali Dickson i wsp. [74], defekt cewki proksymalnej w zakresie resorpcji albuminy oraz uszkodzenie bariery filtracyjnej kłębuszka nie wykluczają się wzajemnie i są potencjalnie współodpowiedzialne za zwiększone wydalanie albuminy na wczesnym etapie CChN.

Kolejnym ogniwem łączącym uszkodzenie kłębuszka nerkowego i cewek może być toksyczne działanie białkomoczu. Uszkodzenie cewek proksymalnych możemy stwierdzić za pomocą wskaźników funkcjonalnych uszkodzenia cewek, mianowicie oceniając wydalone z moczem białka drobnocząsteczkowe, które są swobodnie filtrowane przez kłębuszek, a następnie w warunkach fizjologicznych wychwytywane przez komórki cewki bliższej (w przypadku dysfunkcji resorpcji przez cewkę proksymalną, ich stężenie w moczu wzrasta) lub oceniając wydalanie z moczem wskaźników strukturalnych pochodzących z uszkodzonych cewek. Białka o małej masie cząsteczkowej mogą współzawodniczyć z albuminą o resorpcję w cewce bliższej i to także może być przyczyną ich zwiększonego wydalania z moczem [70].

Jednym z istotnym wskaźników uszkodzenia cewki proksymalnej, będącym markerem strukturalnym, jest KIM-1. Zależność pomiędzy wzrostem stężenia uKIM-1/Cr, a wielkością białkomoczu w grupie chorych z T2DM była analizowana w aspekcie patofizjologicznym przez Conwaya i wsp. [36], którzy tłumaczyli obserwowany wzrost stężenia KIM-1 w moczu efektem toksycznego działania białkomoczu na cewkę proksymalną. Conway i wsp. [36] uznali również, że jest to wskaźnik aktywnego uszkodzenia. Z kolei, jak podkreśla w swojej pracy Yang i wsp. [75], rola jaką odgrywa uKIM-1 w czasie uszkodzenia cewki proksymalnej zależy od charakteru uszkodzenia: w przypadku ostrego uszkodzenia pełni on funkcję receptora, który ułatwia fagocytozę komórek apoptotycznych, natomiast stała aktywacja ekspresji KIM-1 jaka ma miejsce w przypadku procesu przewlekłego może prowadzić do zwłóknienia śródmiąższowego.

Kolejnym ważnym wskaźnikiem należącym do grupy markerów funkcjonalnych jest NGAL. Bolignano i wsp. [46] wykazali, że zwiększonemu stężeniu NGAL w moczu towarzyszy zwiększone wydalanie białka. Uznali, że może to wynikać zarówno z uszkodzenia bariery filtracyjnej, jak również z upośledzenia resorpcji kanalikowej spowodowanej wysyceniem układu megalina-kubulina, innymi białkami filtrowanymi w nadmiarze do moczu. Ponadto, obecność białek osocza w świetle cewek może powodować aktywację alternatywnej drogi układu dopełniacza, co prowadzi do apoptozy ich komórek, a zwiększenie produkcji NGAL w moczu może być związane z jego właściwościami hamującymi proces apoptozy zainicjowany przez dopełniacz.

Wykazane przez autorkę zależności pomiędzy obrazem uzyskanym w badaniu elektroforezy białek moczu a wybranymi wskaźnikami uszkodzenia cewek są zgodne z opisanymi doniesieniami dotyczącymi istotnej roli cewki proksymalnej w patogenezie cukrzycy oraz wnioskami, jakie płyną z prac Conwaya i wsp. [36], Bolignano i wsp. [46] i Yanga i wsp. [75].

W badaniu własnym autorki, w grupie u chorych ze stwierdzonym „ślądem albuminy” w badaniu elektroforezy białek moczu (mediana uACR 5 mg/g), stężenie zarówno uKIM-1, jak i uNGAL było wyższe niż w grupie bez białkomoczu, przy czym różnica dotycząca NGAL nie była istotna statystycznie. Ponadto w badaniu moczu stwierdzano obecność IgG i transferyny, czyli białek, które mogą być traktowane przede wszystkim jako wskaźniki uszkodzenia bariery filtracyjnej. W przypadku grupy chorych z białkomoczem kłębuszkowym (mediana uACR 57,5 mg/g) stwierdzono znacznie wyższe stężenia uKIM-1 oraz NGAL w odniesieniu do dwóch pozostałych grup, a także większą liczbę chorych ze zwiększonym wydalaniem IgG i transferyny, co sugeruje większy stopień zaawansowania uszkodzenia

całego nefronu. Potwierdzają to również wyniki oznaczeń uromoduliny. Stwierdzono m.in., że stężenie uromoduliny w moczu było istotnie statystycznie wyższe w grupie pacjentów ze „śladem albuminy” w badaniu elektroforetycznym w odniesieniu do chorych z białkomoczem kłębuszkowym. Jest to zgodne z obserwacjami Garimella i wsp. [76], którzy wykazali, że stężenie uromoduliny w moczu koreluje ujemnie z ACR. Również Prujim i wsp. [30] uznali, że uromodulina powinna być rozpatrywana jako marker prawidłowej aktywności cewek.

Przeprowadzona analiza i dyskusja uzyskanych zależności pomiędzy grupami wyodrębnionymi w oparciu o wielkość wskaźnika uACR, a stężeniem białek specyficznych w moczu przemawia za istotną rolę uszkodzenia cewki proksymalnej w patogenezie cukrzycy. Grupy z prawidłowym i zwiększonym wydalaniem albuminy nie różniły się istotnie pod względem wieku, BMI oraz czasu trwania cukrzycy. Nie stwierdzano także różnicy w odniesieniu do stężenia kreatyniny oraz wartości wskaźnika filtracji kłębuszkowej oszacowanego przy jej użyciu. Istotne statystycznie różnice między grupami chorych wyróżnionymi ze względu na wartość uACR dotyczyły natomiast, tak jak w przypadku grup wyodrębnionych na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu, stężeń NGAL w moczu oraz wskaźników uNGAL/Cr i uKIM/Cr, a także wskaźnika uL-FABP/Cr (ostatniej zależności nie wykazano w przypadku podziału wg. obrazu elektroforezy). Stwierdzono także dodatnie korelacje powyższych wskaźników ze wskaźnikiem uACR. Stężenie uNGAL w moczu, a także wyższe wartości wskaźników uNGAL/Cr, uKIM1/Cr, uL-FABP/Cr w grupie ze zwiększonym wydalaniem albuminy oraz obserwowane korelacje wskazują na uszkodzenie zarówno cewki proksymalnej, jak i dystalnej w tej grupie chorych i potwierdzają obserwacje z omawianych powyżej prac Conwaya i wsp. [36] oraz Bolignano i wsp. [48], a w przypadku uL-FABP/Cr z opracowania Kamijo-Ikemori i wsp. [55].

Podobnie, jak w przypadku podziału chorych dokonanego na podstawie wyników elektroforezy białek moczu, grupy chorych z prawidłowym i zwiększonym wydalaniem albuminy różniły się częstością wykrywania w moczu transferyny i IgG. W grupie chorych, w której wskaźnik uACR mieścił się poniżej 30 mg/g, rzadziej stwierdzano w badaniu moczu obecność obu białek. Podobne spostrzeżenia w swoim badaniu w odniesieniu do transferyny wykazali Kanauchi i wsp. [41], którzy analizując wyniki 45 chorych z T2DM, podzielili chorych na 3 grupy: (1) osoby z prawidłowym wydalaniem albuminy, (2) ze zwiększonym wydalaniem albuminy, ale bez zmian w zakresie kompartmentu cewkowo-śródmiaższowego oraz (3) z obecnością powyższych zmian w badaniu histopatologicznym wycinków pobranych w trakcie biopsji gruboigłowych. Wydalanie transferyny z moczem wzrastało wraz ze wzrostem wydalania albuminy i było największe w grupie, w której stwierdzono zmiany

strukturalne w obrębie cewek. Na podstawie tych wyników Kanauchi i wsp. [41] uznali, że transferyna może pośredniczyć w toksycznym uszkodzeniu cewki, a co za tym idzie, może nasilać zmiany w obrębie cewek i śródmiaższu. Wykazano również, że wydalanie transferyny jest większe u chorych na cukrzycę w grupie z prawidłowym wydalaniem albuminy z moczem w odniesieniu do grupy kontrolnej [41,77], a nawet jest czynnikiem predykcyjnym rozwoju mikroalbuminurii w tej grupie [78].

W przypadku IgG, wydalanie z moczem, jest podobnie jak w przypadku transferyny większe u pacjentów z cukrzycą w porównaniu z grupą kontrolną, dotyczy to również chorych bez mikroalbuminurii [79,42]. Ponadto, wydalanie IgG z moczem u chorych na cukrzycę z normoalbuminurią jest czynnikiem predykcyjnym rozwoju zwiększonego wydalania albuminy, a także koreluje z wydalaniem transferyny [42].

W badaniach własnych autorki obserwowano chorych z umiarkowanie podwyższoną albuminurią i równocześnie zwiększonym wydalaniem IgG i transferyny z moczem. W pracy autorki stwierdzono nie tylko różnicę w stężeniach wskaźników uszkodzenia nerek pomiędzy grupami wyodrębnionymi na podstawie wskaźnika ACR, ale również w grupie z prawidłowym wydalaniem albuminy obserwowano podwyższone stężenie NGAL oraz KIM-1 w moczu w odniesieniu do stężenia powyższych markerów w grupach kontrolnych [49,80]. Trudności w zakresie jednoznacznej interpretacji powyższych wyników mogą być związane z faktem, że dla opisywanych wskaźników nie pojawiły się dotychczas w literaturze normy wyznaczone dla populacji osób zdrowych.

#### **6.4. Fenotyp CChN bez zwiększonej albuminurii; związki badanych białek z eGFR ocenianym na podstawie stężeń kreatyniny i cystatyny C w surowicy**

Do niedawna CChN rozpatrywana była jedynie jako stan charakteryzujący się liniową progresją białkomoczu, któremu towarzyszy utrata funkcji filtracyjnej przez nerkę. Aktualnie dostępnych jest wiele dowodów na to, że do schyłkowej niewydolności nerek u pacjenta z cukrzycą może dochodzić również bez wzrostu wydalania albuminy. Ważnych informacji w tym zakresie dostarczają badania prowadzone przez Królewskiego i wsp. [5], które obejmowały chorych z T1DM, zarówno z prawidłowym (595 pacjentów), jak i ze zwiększonym wydalaniem albuminy z moczem (513 chorych). W okresie 4–10 lat obserwacji, wykonywano u tych pacjentów pomiary stężenia kreatyniny i cystatyny C w surowicy w celu oceny zmian funkcji filtracyjnej nerek w czasie. Na podstawie uzyskanych wyników, chorych podzielono na grupy: pacjentów ze stabilną czynnością nerek; chorych ze spadkiem eGFR mniejszym niż 3,3% rocznie oraz pacjentów, u których obserwowany spadek

funkcji filtracyjnej nerek był większy niż 3,3% w ciągu roku. W grupie chorych z prawidłowym wydalaniem albuminy u ok. 10% stwierdzono znaczny spadek funkcji filtracyjnej według powyżej przyjętych kryteriów, a w grupie chorych ze zwiększonym wydalaniem albuminy, znaczny spadek GFR dotyczył już 32% chorych. Na podstawie powyższych obserwacji Królewski i wsp. [5] zaproponowali nowy paradygmat dotyczący CChN, którym jest postępujące upośledzenie funkcji filtracyjnej nerek rozpoczynające się już u chorych z prawidłowym eGFR i nakładające się na proces nieprawidłowego wydalania albuminy. Wielkość albuminurii może zmieniać się w czasie, a u chorych okresowo może być stwierdzana zarówno progresja, jak i regresja białkomoczu. Jednak wg obserwacji Królewskiego i wsp. [5] upośledzenie czynności filtracyjnej nerek jest procesem jednokierunkowym, który stopniowo prowadzi do schyłkowej niewydolności nerek. W innej pracy opublikowanej w 2017 roku przez ten sam zespół pod kierunkiem prof. Królewskiego [81] przedstawiono wyniki analizy zależności pomiędzy utratą funkcji filtracyjnej nerek u 364 chorych z T1DM, a czasem dalszej obserwacji. U 87% pacjentów spadek GFR był liniowy, natomiast u pozostałych 13% obserwowano przyspieszenie lub spowolnienie procesu utraty funkcji filtracyjnej. Dodatkowo, Królewski i wsp. [81] podzielili grupę badanych pod względem czasu, w jakim chorzy rozwijają schyłkową niewydolność nerek, wyodrębniając grupę, u których PChN w stadium G5 wystąpi w ciągu 2-6 lat (grupa „bardzo szybka”), 6-10 lat (grupa „szybka”), 10-20 lat (grupa „umiarkowana”), oraz 20-45 lat (grupa „powolna”). Grupy te różniły się pod względem wartości HbA<sub>1c</sub>. Ponadto we wszystkich wymienionych grupach pierwszy kwartyl w zakresie wskaźnika uACR wynosił 0,5 mg/g, co oznacza, że utrata funkcji filtracyjnej nerek także w przypadku chorych, u których proces ten przebiega bardzo szybko, rozpoczynała się już przy prawidłowym wydalaniu albuminy. Ważnym aspektem badania Królewskiego i wsp. [81] była też ocena utraty funkcji filtracyjnej nerek u chorych z T2DM w grupach wyodrębnionych na podstawie wielkości wskaźnika uACR. W grupie z prawidłowym wydalaniem albuminy u 80% chorych obserwowano spadek funkcji filtracyjnej o mniej niż 2,9 ml/min/1.73m<sup>2</sup> w ciągu roku, u 13% pacjentów spadek ten mieścił się od 3-4,9 ml/min/1.73m<sup>2</sup> w ciągu roku, u 6% chorych w przedziale od 5-9,9 ml/min/1.73m<sup>2</sup>/rok, a u 1% wielkość ta mieściła się powyżej 10 ml/min/1.73m<sup>2</sup> w ciągu roku. W przypadku zwiększonego wydalania albuminy (uACR >30-300 mg/g) procentowy udział chorych wynosił odpowiednio: 67%, 18%, 12% i 3%. U pacjentów z jawnym białkomoczem obserwowano znacznie większy odsetek chorych, u których utrata funkcji filtracyjnej była szybka: 5-9,9 ml/min/1.73m<sup>2</sup>/rok u 30% oraz >10 ml/min/1.73m<sup>2</sup>/rok u 21% [81].



W badaniu przeprowadzonym przez Vistisen i wsp. [82] w grupie chorych z T1DM i T2DM wykazano stałą tendencję do utraty funkcji filtracyjnej u wszystkich chorych niezależnie od ich statusu w zakresie wydalania albuminy, od momentu, kiedy osiągną oni stadium 3 PChN. Średnie roczne spadki eGFR dla normo-, mikro- i makroalbuminurii w pierwszych 10 latach od chwili osiągnięcia stadium 3 PChN wyniosły odpowiednio 1,9; 2,3 i 3,3 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> w przebiegu T1DM oraz 1,9; 2,1 i 3,0 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> w T2DM [82].

Zarówno wyniki badania Vistisen i wsp. [82], jak i Królewskiego i wsp. [81] dotyczące spadku funkcji filtracyjnej nerek u chorych z prawidłowym wydalaniem albuminy, potwierdzają, jak ważnym elementem obserwacji i leczenia pacjentów jest jednoczesne monitorowanie albuminurii oraz wielkości eGFR u chorego. Obie grupy badawcze podkreślają przy tym potrzebę poszukiwania nowych wskaźników, które pozwoliłyby identyfikować osoby najbardziej zagrożone postępem CChN, zwłaszcza wśród chorych bez zwiększonego wydalania albuminy.

Celem badania podjętego przez autorkę pracy była próba odpowiedzi na pytanie, czy takim markerami mogłyby być cystatyna C, uromodulina i NGAL oznaczane w surowicy chorych z T2DM i przeanalizowanie zależności pomiędzy stężeniami wyżej wymienionych białek a wielkością wskaźnika filtracji kłębuszkowej (eGFR CKD-EPI<sub>Cr</sub>).

Podgrupy pacjentów wyodrębnione na podstawie wartości eGFR CKD-EPI<sub>Cr</sub> różniły się przede wszystkim pod względem wieku. Pacjenci z grupy, w której eGFR CKD-EPI<sub>Cr</sub> mieścił się w zakresie od 30-60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> byli najstarsi i obserwacja ta pozostaje zgodna z doniesieniami zarówno Deroso i wsp. [83], jak i Baba i wsp. [84]. W cytowanych badaniach wykazano, że spadek eGFR związany z wiekiem jest obserwowany już od 40 roku życia i wynosi ok. 1 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> w populacji bez choroby nerek. Natomiast w przypadku trzech grup wyodrębnionych przez autorkę na podstawie eGFR nie wykazano różnic w zakresie wielkości wskaźnika uACR, mimo, że w grupie z eGFR w przedziale 60-90 ml/min/1.73m<sup>2</sup> oraz 30-60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> obecni byli chorzy ze zwiększonym wydalaniem albuminy (górny kwartyl >30 mg/g).

Zgodnie z przewidywaniami autorki, w grupie chorych z eGFR>90 ml/min/1.73m<sup>2</sup> stężenie cystatyny C w surowicy było najniższe, a eGFR oszacowany według wzoru CKD-EPI<sub>CysC</sub> osiągał najwyższą wartość. Była to różnica istotna statystycznie w porównaniu do dwóch pozostałych grup. Wyniki te pozostają zgodne z obserwacjami Yang i wsp. [85], którzy porównywali zmiany stężenia cystatyny C oraz kreatyniny u 102 pacjentów z T2DM, u których 34,3% stanowili chorzy z PChN w stadium G1, ok. 40,4% w stadium G2 PChN i 25,3% w stadium G3 PChN [85]. Średnie stężenie cystatyny C było wyższe w grupie

chorych z PChN G1 w porównaniu do grupy chorych z G2. Powyższej zależności nie obserwowano jednak w odniesieniu do kreatyniny. W badaniu Yang i wsp. [85] nie podano jednak, jaki procent chorych w poszczególnych stadiach PChN stanowili pacjenci z prawidłowym oraz zwiększonym wydalaniem albuminy.

Do tego aspektu odniosła się natomiast grupa badaczy Brjesh i wsp. [86], którzy podkreślili rolę cystatyny C nie tylko jako wskaźnika utraty funkcji filtracyjnej u chorych na wczesnym etapie CChN w przebiegu T2DM, ale również jako markera uszkodzenia bariery filtracyjnej. Podobne wnioski, sugerujące przewagę oznaczeń cystatyny C nad kreatyniną przedstawiła grupa badawcza Coll i wsp. [87], która wykazała, że stężenie cystatyny C w surowicy rośnie, jeśli GFR wynosi ok. 90 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, z kolei stężenie kreatyniny wzrasta dopiero, gdy wielkość eGFR mieści się poniżej 75 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Przy tym stężenie cystatyny C w surowicy było istotnie statystycznie niższe w grupie z niską albuminurią w porównaniu do grupy z umiarkowanie podwyższoną albuminurią. Dodatkowo wskaźnik filtracji kłębuszkowej oszacowany przy użyciu cystatyny C był istotnie wyższy w grupie z uACR <30 mg/g [87]. Z kolei w badaniach prowadzonych przez Jeon i wsp. [88] w grupie 332 chorych z T2DM wykazano, że wraz ze wzrostem wydalania albuminy mierzonym wartością wskaźnika uACR wzrastało również stężenie cystatyny C w surowicy, osiągając najwyższą wartość w grupie chorych z jawnym białkomoczem. Podobną zależność stwierdzano w przypadku kreatyniny, co jednak nie znalazło potwierdzenia w wynikach uzyskanych przez autorkę rozprawy.

W pełni zgodne z obserwacjami, jakich dokonała w swojej pracy autorka są natomiast wyniki Brijesh i wsp. [86], którzy podzielili chorych biorących udział w badaniu na grupy pod względem czasu trwania cukrzycy. Wykazano m.in., że w grupach chorych ze zwiększonym wydalaniem albuminy (grupa II: czas trwania cukrzycy 10-15 lat, albumina w pojedynczej porcji moczu: 37,58 ± 17,57 mg/l i grupa III: czas trwania cukrzycy >15 lat, albumina w pojedynczej porcji moczu: 131,68 ± 51,54 mg/l), wartości stężenia cystatyny C są znamienne wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (albumina w pojedynczej porcji moczu: 7,94 ± 2,77 mg/l). Podwyższone stężenia kreatyniny obserwowano dopiero w grupie chorych o najdłuższym czasie trwania choroby oraz największej utracie albuminy z moczem. Podobne obserwacje opisali w swych pracach Peralta i wsp. [89] oraz Christensson i wsp. [90]. Na podstawie ich doniesień można wysunąć wniosek, że cystatyna C pozostaje lepszym wskaźnikiem w ocenie zdolności filtracyjnej nerki na wczesnym etapie CChN, kiedy zmiany strukturalne w obrębie nefronu nie są jeszcze znacząco nasilone.

Na podstawie wyników badań autorki pracy wykazano obecność licznych korelacji pomiędzy stężeniem cystatyny C w surowicy i eGFR szacowanym przy użyciu cystatyny C a wskaźnikami uszkodzenia nerek. Jednocześnie nie wszystkie z tych związków obserwowano w przypadku kreatyniny. Stężenie cystatyny C w surowicy wykazywało dodatni związek nie tylko z umiarkowanie nasiloną albuminurią, ale również ze stężeniami NGAL i uPAR w surowicy, obecnością IgG i transferyny w moczu oraz stężeniem uromoduliny w surowicy.

Ciekawym odniesieniem do diskutowanych wyników autorki może być praca Okura i wsp. [91], w której grupę badaną stanowili chorzy z nadciśnieniem tętniczym. W powyższej pracy stwierdzono zależność pomiędzy cystatyną C a wskaźnikami stanu zapalnego: interleukiną 6 i czynnikiem martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), których nie obserwowano w przypadku kreatyniny.

Zależność pomiędzy stężeniem uromoduliny w surowicy a wartością eGFR szacowaną przy użyciu cystatyny C potwierdzono z kolei w pracy Risch i wsp. [92] w grupie 60-letnich ochotników. Uromodulinę analizowano w tej pracy jako jeden z dodatkowych wskaźników mogących uzupełnić dane dotyczące funkcji filtracyjnej nerek uzyskane przy pomocy kreatyniny. Jej stężenie w surowicy było istotnie statystycznie wyższe w grupie osób z eGFR > 90 ml/min/1.73m<sup>2</sup> i eGFR w zakresie 60-90 ml/min/1.73m<sup>2</sup> w porównaniu do grupy z eGFR 30-60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Podobną zależność pomiędzy stężeniem uromoduliny w surowicy a czynnością nerek ocenianą za pomocą GFR wykazał w grupie 426 pacjentów Steubl i wsp. [93]. W pracy tej wykazano obniżanie się stężenia uromoduliny w surowicy wraz z postępem PChN. Średnie stężenie w grupie chorych z PChN w stadium G1 wynosiło 111,0 ng/ml, natomiast najwyższe wartości stężeń stwierdzano u chorych z grupy kontrolnej: 167,6 ng/ml. Analiza tych wyników pozwoliła dodatkowo na wysunięcie wniosku, że uromodulina może być bezpośrednim wskaźnikiem ilości nieuszkodzonych cewek i może stanowić odzwierciedlenie liczby pozostałych działających nefronów. Uznano również, że monitorowanie jej stężenia w surowicy może być doskonałym parametrem pozwalającym na wyodrębnienie chorych bez PChN. Podobne obserwacje przedstawili Leisher i wsp. [94], którzy wykazali istotną różnicę w stężeniu uromoduliny w surowicy pomiędzy grupą chorych z PChN w poszczególnych stadiach (G1 i G2, G2 i G3a, G3 i G4). Należy zauważyć, że zarówno w badaniu Steubla i wsp. [93], jak i Leishera i wsp. [94], chorzy z cukrzycą stanowili zaledwie część badanej populacji pacjentów z PChN. Dlatego też należałoby postawić pytanie, na ile ich spostrzeżenia można odnieść bezpośrednio do populacji chorych z T2DM.

W przeciwieństwie do wyżej wymienionych prac, w których autorzy dokonywali jednorazowego pomiaru stężenia uromoduliny, Minacovic i wsp. [95] przeprowadzili serię oznaczeń, która pozwoliła na następującą interpretację: jeśli u pacjentów nie stwierdza się żadnej choroby, to niskie stężenie uromoduliny w surowicy pozwala na wytypowanie chorych z grupy ryzyka wystąpienia PChN. Z kolei, u pacjentów z T2DM z zachowaną funkcją filtracyjną nerek obserwowany wzrost stężenia uromoduliny, zarówno w surowicy, jak i w moczu był wyrazem mechanizmu ochronnego. W przypadku upośledzonej funkcji filtracyjnej nerek u chorych z cukrzycą stopniowe obniżanie się stężenia uromoduliny w surowicy było związane z postępem choroby nerek [95].

Autorka pracy przeprowadziła ilościowe oznaczenie stężenia uromoduliny w moczu, jak również dokonała interpretacji obrazu uzyskanego podczas powadzonego rozdziału elektroforetycznego moczu. Wykazano, że obecność prążka uromoduliny w rozdziale elektroforetycznym towarzyszy najczęściej słabemu prążkowi albuminy. W wyróżnionej podgrupie chorych A (obecność śladowego prążka albuminy), obecność uromoduliny w elektroforezie białek moczu stwierdzono u 29 pacjentów (40% tych chorych), natomiast w podgrupie K (pacjenci z białkomoczem kłębuszkowym) u 4 (18%) chorych. Zarówno powyższe, dane jak i obserwowane zależności dotyczące kolejnych wskaźników uACR, uKIM-1/uCr, uL-FABP/uCr w grupie chorych z obecnością prążka uromoduliny mogą dowodzić słuszności spostrzeżeń dokonanych przez Prujim i wsp. [30] wskazujących na uromodulinę jako wskaźnik prawidłowej aktywności cewek. Niższe wartości uKIM-1/uCr obserwowane w grupie chorych z obecnym prążkiem uromoduliny wydają się zgodne z sugerowanym przez Maydan i wsp. [96] bezpośrednim związkiem pomiędzy tymi dwoma wskaźnikami. Badanie Maydan i wsp. [96] dotyczyło modelu zwierzęcego (mysiego), w którym autorzy wykazali hamujący wpływ uromoduliny na ekspresję KIM-1 u myszy. Myszy z genetycznym zaburzeniem ekspresji uromoduliny osiągały wyższe stężenia KIM-1 w odpowiedzi na uszkodzenie cewek.

Trzecim parametrem, którego stężenie w surowicy znacząco różniło się w grupach chorych z eGFR  $>90$  ml/min/1.73m<sup>2</sup> w odniesieniu do grupy z eGFR w przedziale 30-60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, było stężenie NGAL w surowicy. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami Bjornstad i wsp. [97], którzy analizowali zależność pomiędzy zmianą stężenia NGAL w surowicy, a hemodynamiką zmian zachodzących w nerce u chorych z T1DM. Zauważono m.in., że im wyższe stężenie NGAL w surowicy u chorych, tym gorsza była funkcja filtracyjna nerek oraz wyższy nerkowy opór naczyniowy. W badaniu tym wykazano również zależność pomiędzy zmianą stężenia NGAL w surowicy, a wzrostem ciśnienia w tętniczce

doprowadzającej, przyczyniającej się do spadku filtracji w obrębie nerki. W pracy brak jednak szerszej dyskusji uzyskanych wyników, a mechanizm opisanych zależności nie jest w pełni jasny i może być związany z uszkodzeniem cewki proksymalnej, prowadzącym do zwiększenia lokalnej produkcji angiotensynogenu, a następnie wzrostu lokalnej aktywacji układu renina-angiotensyna-aldosteron.

Zupełnie inną interpretację stężenia NGAL w surowicy zaproponowali w swojej pracy Mori i wsp. [98], którzy przyjęli, że wzrost stężenia NGAL może być wskaźnikiem aktywnego uszkodzenia nerek w czasie rzeczywistym. W celu wyjaśnienia swojej teorii, posłużyli się dość obrazową koncepcją „pożaru lasu”: las (nerka) składa się z drzew (nefronów). Stężenie kreatyniny odzwierciedla w niej ilość działających nefronów, podczas gdy stężenie NGAL w surowicy wskazuje na zakres aktywnych zmian destrukcyjnych zachodzących w nerce.

Kolejnym badanym przez autorkę parametrem analizowanym w grupach wyodrębnionych na podstawie wielkości eGFR było stężenie KIM-1 w moczu. Najwyższe stężenie uKIM-1 obserwowano w grupie z eGFR >90 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Mimo, że zależność ta nie była istotna statycznie, autorce udało się wykazać słabą dodatnią korelację uKIM-1 z wielkością eGFR. uKIM-1 należy do parametrów stosunkowo często badanych w ostatnim czasie, a jednym z ciekawszych doniesień może być badanie Nowaka i wsp. [99], w którym wykazano, że wartość stężenia KIM-1 w moczu może być czynnikiem ryzyka wystąpienia wczesnej utraty funkcji filtracyjnej u chorych z T2DM. Niestety, po przeprowadzeniu analizy wieloczynnikowej, w której wzięto pod uwagę wielkość uACR, obecność nadciśnienia tętniczego, wiek i czas trwania cukrzycy, wartości uKIM-1 nie osiągały istotności statystycznej.

## **6.5. Związek badanych białek z istotnymi klinicznymi czynnikami wpływającymi na rozwój CChN**

Chorzy z CChN są bardziej narażeni na możliwość wystąpienia progresji do schyłkowej niewydolności nerek, a także cechują się zwiększoną zapadalnością na choroby sercowo-naczyniowe. Istnieje kilka potencjalnych czynników mogących wpływać na rozwój i przebieg CChN. Najczęściej dzielimy je na modyfikowalne oraz niemodyfikowalne. Głównymi niemodyfikowalnymi czynnikami są: płeć, rasa, czas trwania cukrzycy, a także wiek chorego. Uważa się, że mężczyźni są bardziej narażeni na rozwój CChN w porównaniu do kobiet i to zarówno w przypadku T2DM, jak i T1DM [100]. W dyskutowanej już wcześniej pracy Fioretto i wsp. [67] nie stwierdzano istotnych zależności pomiędzy wiekiem

chorych a ocenianym obrazem histopatologicznym. Podobnych zależności nie wykazano również w pracach prof. Królewskiego i wsp. [81].

Grupy wyodrębnione na podstawie wyników elektroforezy białek w moczu, uzyskane przez autorkę pracy nie różniły się pod względem wieku. Różnice takie pojawiły się natomiast w przypadku podziału badanych pod względem wartości funkcji filtracyjnej. Chorzy z  $eGFR >90\text{ ml/min/1.73m}^2$  byli najmłodszy. Ponadto w badanej grupie chorych z T2DM wykazano dodatnie zależności między stężeniami cystatyny C i uPAR w surowicy oraz wiekiem pacjentów. W odniesieniu do cystatyny C, w badaniu Oddena i wsp. [101] potwierdzono związek pomiędzy jej stężeniem w surowicy a wiekiem chorych. Badanie to było prowadzone w grupie bez chorób współistniejących. Podobne wyniki uzyskali Kottgen i wsp. [102], którzy stwierdzili, że częstość występowania podwyższonego stężenia cystatyny C rośnie wraz z wiekiem, osiągając ponad 50% wzrost po ukończeniu 80-roku życia, u obu płci i we wszystkich grupach etnicznych. Może być to związane z faktem, że nawet wśród osób dorosłych i bez cukrzycy w ogólnej populacji, funkcja filtracyjna nerek nerek pogarsza się w tempie około  $1\text{ ml/minutę/1.73m}^2$ /rocznie po przekroczeniu 40 roku życia.

Z kolei obserwowana przez autorkę, dodatnia zależność stężenia uPAR w surowicy z wiekiem chorych pozostaje zgodna z doniesieniami Wada i wsp. [103], którzy wykazali wzrost uPAR z wiekiem w grupie chorych z FSGS.

Kolejnym wskaźnikiem ocenionym przez autorkę pracy, który korelował z wiekiem badanych, była uromodulina. W tym przypadku była to korelacja ujemna. Obserwacja ta znalazła odzwierciedlenie w doniesieniach opublikowanych w badaniu Prujim i wsp. [30]. Również słabą dodatnią korelację z wiekiem stwierdzano w przypadku L-FABP, a wyniki te znalazły potwierdzenie w pracy przeprowadzonej przez Ishimura i wsp. [104].

Wśród modyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju CChN głównym jest przewlekła hiperglikemia. W badaniu UKPDS [105] przeprowadzonym u chorych z T2DM zaobserwowano istotny związek pomiędzy kontrolą glikemii a ryzykiem rozwoju powikłań mikronaczyniowych, chociaż nie określono konkretnej wartości  $HbA_{1c}$ , przy której ryzyko CChN wzrastało. Z kolei z dużego badania ADVANCE [106] obejmującego chorych z T2DM, u których wartość  $HbA_{1c}$  wahała się w przedziale od 5,5% do 10,5%, wynikało, że w grupie pacjentów, u których wartość  $HbA_{1c}$  nie przekraczała 6,5%, nie stwierdza się wzrostu częstości powikłań mikroangiopatycznych. Z badań przeprowadzonych przez Królewskiego i wsp. [108] wynika również, że ryzyko wystąpienia mikroalbuminurii wzrasta gwałtownie u chorych, u których wartość  $HbA_{1c}$  przekracza 8,1%.

Wpływ hiperglikemii na rozwój i przebieg CChN związany jest nie tylko z wartością bezwzględną HbA<sub>1c</sub>, ale także jej zmiennością. Pomimo zbliżonej średniej wartości HbA<sub>1c</sub>, u pacjentów możemy obserwować znaczne wahania w zakresie glikemii. Dane z badania fińskiego dotyczącego CChN (FinnDiane) [108] pozwalają na potwierdzenie wpływu zmienności w zakresie uzyskiwanych wartości HbA<sub>1c</sub> na rozwój CChN. Największą częstość występowania CChN zaobserwowano w grupie chorych, u których, zarówno wartość średnia, jak i odchylenie standardowe HbA<sub>1c</sub> znajdowały się powyżej mediany.

W najnowszym badaniu przeprowadzonym przez DCCT/EDIC (*Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*) [109] wykazano, że długoterminowe ryzyko pogorszenia funkcji filtracyjnej (<60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) malało u chorych z T2DM, u których od początku leczenia dążono do dobrego wyrównania metabolicznego cukrzycy. Do podobnych wniosków prowadzą wyniki badania ADVANCE [110], w którym stwierdzono mniejsze ryzyko rozwoju schyłkowej niewydolności nerek u chorych z T2DM oraz lepszym wyrównaniem glikemii. Także wyniki pochodzące z Centrum Diabetologicznego Joslin sugerują, że trwała poprawa w zakresie kontroli glikemii u pacjentów z T1DM i jawnym białkomoczem może zmniejszyć długoterminowe ryzyko związane z wystąpieniem stadium 5 PChN [111]. Grupa badaczy pod kierunkiem prof. Królewskiego i wsp. [81] zwraca dodatkowo uwagę, że u pacjentów z T1DM najszybszą progresję CChN obserwowano w grupie chorych z najwyższą wartością HbA<sub>1c</sub>.

Odnosząc się do wyników własnych, autorka zaobserwowała, że najwyższą wartość HbA<sub>1c</sub> stwierdzano u chorych z białkomoczem kłębuszkowym, co pozostaje zgodne z przytoczonymi wcześniej doniesieniami. Stopień wyrównania cukrzycy monitorowany za pomocą HbA<sub>1c</sub>, korelował dodatnio ze stężeniem uNGAL w moczu i wskaźnikiem uNGAL/uCr, wskaźnikiem uKIM-1/uCr, stężeniami IgG i transferyny w moczu oraz uPAR w surowicy. Obserwowano ponadto słabą dodatnią korelację między stężeniem L-FABP w moczu oraz stężeniem glukozy w surowicy pacjentów. Znajduje to odzwierciedlenie w przytaczanym wcześniej badaniu Fioretto i wsp. [67], w którym grupy wyodrębnione na podstawie wyników biopsji histopatologicznych różniły się pod względem wartości HbA<sub>1c</sub>. Najwyższą wartość HbA<sub>1c</sub> stwierdzano w grupie chorych ze zmianami typowymi dla CChN, w której nieprawidłowości strukturalne dotyczyły zarówno kłębuszków, jak i śródmiąższu, natomiast najniższą u pacjentów bez obecności opisanych zmian.

Istotnym i podkreślanym w wielu pracach czynnikiem patogenetycznym u pacjentów z T2DM jest aktywacja wrodzonego układu odpornościowego, a także przewlekłe zapalenie o niskim stopniu nasilenia. W badaniach przekrojowych i prospektywnych wykazano

podwyższone stężenia w surowicy zarówno białek ostrej fazy: białka C-reaktywnego (CRP), haptoglobiny, fibrynogenu, inhibitora aktywatora plazminogenu, osoczowego białka amyloidowego A, jak również innych markerów i mediatorów zapalenia, w tym cytokin i chemokin. Podwyższone stężenia interleukiny-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 i CRP w surowicy są uznawane za czynnik ryzyka wystąpienia T2DM. Podobnie, stężenie antagonisty receptora IL-1 (IL-1RA) w surowicy jest podwyższone w otyłości i w stanie przedcukrzycowym. Ekspresja IL-1RA, indukowana przez IL-1 $\beta$ , odzwierciedla odpowiedź organizmu jako przeciwwagę dla zwiększonej aktywności IL-1 $\beta$ . Większość czynników prozapalnych obecnych w podwyższonym stężeniu we krwi pacjentów z T2DM pozostaje zależna od działania IL-1 $\beta$ , dlatego też blokowanie aktywności IL-1 mające na celu zmniejszenie nasilenia rozległości procesu zapalnego rozpatrywane jest jako jedna z koncepcji terapeutycznych w tej grupie chorych [112].

W badaniu przeprowadzonym przez Wolkowa i wsp. [113] analizowano zależność pomiędzy stężeniami wskaźników stanu zapalnego a pogorszeniem funkcji filtracyjnej nerek u chorych z T1DM. Uzyskane wyjściowo wyższe stężenia markerów zapalnych w moczu stwierdzono u chorych, u których w toku dalszej obserwacji dochodziło do szybkiego, wczesnego pogorszenia funkcji filtracyjnej nerek  $>3$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> rocznie w porównaniu z tymi, którzy charakteryzowali się stabilną funkcją filtracyjną [113]. W oparciu o wyniki własne, autorka pracy zwraca uwagę na obecność znamiennych korelacji pomiędzy stężeniami CRP i NGAL, uPAR i cystatyny C w surowicy, przy czym korelacja z uPAR była najsilniejsza, natomiast korelacja z cystatyną C słaba. Wykazano także słabe, chociaż istotne statystycznie dodatnie zależności między stężeniem CRP w surowicy a stężeniami białek wielkocząsteczkowych IgG i transferyny w moczu.

Rola dyslipidemii w inicjacji i progresji CChN pozostaje nadal nie w pełni wyjaśniona. Potwierdzono wiele zależności między dyslipoproteinemią i stężeniami lipoproteiny zawierającej apo B100, cholesterolu-HDL oraz wydalaniem albuminy. W badaniu ADVANCE [114] niskie wyjściowe stężenia cholesterolu we frakcji HDL były związane ze znacznie podwyższonym ryzykiem rozwoju zwiększonego wydalania albuminy, podobnie jak w przypadku podwyższonego stężenia trójglicerydów przedstawionym w raporcie badania DCCT/EDIC [115]. W badaniu pochodzącym z Joslin Diabetes Center zwrócono szczególną uwagę na wyraźną regresję mikroalbuminurii związaną z niskim stężeniem cholesterolu-LDL i obniżeniem stężenia trójglicerydów w surowicy [116].

W pracy autorki żaden z badanych wskaźników uszkodzenia nerek nie korelował istotnie statystycznie ze stężeniem cholesterolu całkowitego. Obserwowano natomiast szereg



znamiennych korelacji między badanymi markerami uszkodzenia nerek a stężeniami cholesterolu we frakcjach LDL i HDL oraz stężeniem trójglicerydów w surowicy pacjentów. Stężenie LDL-cholesterolu wykazywało słabą ujemną korelację z uKIM1/uCr, co pozostaje w sprzeczności z pozostałymi wynikami uzyskanymi przez autorkę, w których wartość wskaźnika uKIM-1/uCr była wyższa u chorych z rozpoznaniem choroby sercowo-naczyniowej. Podobne dane można znaleźć w badaniu przeprowadzonym przez Carlsson i wsp. [117], w którym wyższa wartość wskaźnika uKMI-1/Cr wiązała się z wyższym ryzykiem śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych.

Stężenie uromoduliny w surowicy było niższe u chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowymi i wykazywało słabą ujemną korelację ze stężeniem trójglicerydów, natomiast dodatnią korelację ze stężeniem cholesterolu we frakcji LDL. Powyższe zależności były również przedmiotem analizy w badaniu Leisherer i wsp. [118], którzy oznaczyli stężenie uromoduliny u 529 pacjentów bez ostrego zespołu wieńcowego, poddawanych angiografii wieńcowej w celu oceny stwierdzonej lub podejrzewanej stabilnej choroby wieńcowej, a także zdarzeń sercowo-naczyniowych. W badaniu tym stwierdzono istnienie słabej ujemnej korelacji między stężeniem uromoduliny a cholesterolem LDL. Nie obserwowano przy tym żadnych zależności w odniesieniu do pozostałych składowych lipidogramu tj. cholesterolu HDL i trójglicerydów. W ciągu 8 lat prowadzonej obserwacji zarejestrowano 95 zgonów i 145 zdarzeń sercowo-naczyniowych. Wyciągnięto wnioski, że ocena stężenia uromoduliny w surowicy może być źródłem praktycznych informacji, a jej wysoki poziom w surowicy ma znaczenie ochronne. W grupie chorych z najwyższym stężeniem uromoduliny w surowicy obserwowano najniższą śmiertelność oraz ilość epizodów sercowo-naczyniowych, nawet po wzięciu pod uwagę innych czynników ryzyka tj. palenia tytoniu i cukrzycy [118].

W odniesieniu do znaczenia pomiarów cystatyny C, w pracy autorki obserwowano ujemną korelację ze stężeniem cholesterolu HDL, jej stężenie było również wyższe u pacjentów, u których stwierdzano obecność powikłań sercowo-naczyniowych. Wyniki te są zgodne z doniesieniami publikowanymi w ostatnich latach między innymi w pracach Lassus i wsp. [119] oraz Salgado i wsp. [120], w których stwierdzono wykazaną wyżej zależność w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym. Podobnie, w innych badaniach epidemiologicznych [121] odnotowano związek między wyższym stężeniem cystatyny C w surowicy, a zwiększoną częstością występowania chorób sercowo-naczyniowych u osób z  $GFR \geq 60$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Badanie przeprowadzone przez Urbonaviciene i wsp. [122] wykazało również, że wyższe cystatyny C w surowicy było czynnikiem prognostycznym 5-letniej śmiertelności ogólnej i wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów

z objawową chorobą tętnic obwodowych i prawidłową czynnością nerek. Mechanizm tłumaczący zależność między wysokim stężeniem cystatyny C w surowicy a większą częstością incydentów sercowo-naczyniowych pozostaje stosunkowo mało poznany. Przyjmuje się, że pomiar stężenia cystatyny C może być użyteczny we wczesnym stadium zaawansowania choroby nerek, która jest czynnikiem ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych. W wielu badaniach podkreśla się również istotny związek między wysokim stężeniem cystatyny C i białka C-reaktywnego oraz wyższą częstością incydentów sercowo-naczyniowych i przedwczesną śmiercią w populacji osób starszych. Według Urbonaviciene i wsp. [122], cystatyna C może być markerem uzupełniającym proces diagnostyczny pod kątem rozpoznawania wczesnych zaburzeń czynności nerek u pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym o niskim stopniu nasilenia.

W pracy autorki stężenie NGAL mierzone w surowicy korelowało ujemnie jedynie z cholesterolem we frakcji HDL. Podobną zależność stwierdzono w badaniu Woitas i wsp. [124], w którym oceniono predykcyjną rolę NGAL w śmiertelności całkowitej i sercowo-naczyniowej u pacjentów poddawanych angiografii wieńcowej. W okresie 10-letniej obserwacji, NGAL oznaczono w osoczu 2997 osób. U 2358 pacjentów rozpoznano chorobę wieńcową, pozostałe 638 osób stanowiło grupę kontrolną. Najwyższą śmiertelność z powodu zdarzeń sercowo-naczyniowych zarejestrowano u pacjentów z najwyższym stężeniem NGAL, nawet po uwzględnieniu wieku i płci. Wyniki badań autorki nie pozwalają jednak na wyciągnięcie podobnych wniosków, w grupie chorych z powikłaniami sercowo-naczyniowym nie stwierdzano wyższego stężenia NGAL w surowicy.

W przypadku oznaczeń L-FABP w moczu, autorka pracy zwraca uwagę na obecność ujemnej korelacji ze stężeniem cholesterolu frakcji HDL oraz trójglicerydami. Nie zaobserwowano natomiast zależności pomiędzy stężeniem L-FABP a obecnością powikłań sercowo-naczyniowych, tak jak to miało miejsce w badaniu Araki i wsp. [56], które zwracało uwagę na znaczenie pomiarów stężenia L-FABP w moczu jako czynnika prognostycznego chorób układu sercowo-naczyniowego u pacjentów z T2DM, bez cech zaawansowanej nefropatii. Wyższe stężenia L-FABP w moczu były związane z pogorszeniem czynności nerek i częstszym występowaniem epizodów sercowo-naczyniowych. Zależności te zaobserwowano u osób z normoalbuminurią jak i mikroalbuminurią.

Ostatnim z analizowanych przez autorkę parametrów pod kątem przydatności w ocenie ryzyka wystąpienia schorzeń sercowo-naczyniowych był pomiar stężenia uPAR w surowicy. Wykazano, że jego stężenie korelowało ujemnie ze stężeniem HDL-cholesterolu oraz dodatkowo ze stężeniem trójglicerydów, było również wyższe u chorych z rozpoznaniem

choroby sercowo-naczyniowej. W literaturze brak jest jednoznacznych danych na temat badania korelacji z dyslipoproteinemią. Pomiar uPAR w surowicy stanowi jednak uznawany wskaźnik, istotny w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego. Ostatnie doniesienia wskazują również, że uPAR może być częścią szlaku patofizjologicznego, innego niż znane dotychczas markery zapalne (CRP), związanego z rozwojem miażdżycy [124].

W badaniu MONICA [125], w którym porównywano uPAR z CRP, stwierdzono, że uPAR silnie koreluje z dysfunkcją śródbłonna, natomiast w badaniu DanRisk [126] wykazano, że nasilenie zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych jest bardzo silnie skorelowane z wyższym stężeniem uPAR w surowicy.

W pracy autorki analizowano obecność powikłań z kręgu mikroangiopatii. Retinopatia cukrzycowa to jedno z dwóch głównych powikłań mikronaczyniowych występujące u pacjentów z cukrzycą typu 1 i cukrzycy typu 2. W badaniu Rodríguez-Poncelas i wsp. [127] wykazano, że u chorych z cukrzycą typu 2, u których stwierdza się wyższą wartość wskaźnika uACR, częściej występuje retinopatia cukrzycowa. Zależność ta była istotna już od wartości uACR 10 mg/g. W badaniu Rodríguez-Poncelas i wsp. [127] zaobserwowano także, że wartości eGFR  $<45$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> były związane z wyższym rozpowszechnieniem retinopatii cukrzycowej, ale nie stwierdzono tego związku z poziomami eGFR  $>45$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Wśród badanych przez autorkę markerów uszkodzenia nerek związek z obecnością retinopatii wykazano jedynie dla wskaźnika uMOD/uCr (obserwowano niższe wartości u chorych z retinopatią) i stężen L-FABP w moczu (obserwowano wyższe stężenia u chorych z retinopatią), być może ze względu na fakt, że wyniki badania okulistycznego nie były dostępne u wszystkich chorych. Nie ma dostępnych danych na temat bezpośredniego związku między retinopatią a powyższymi wskaźnikami, jedynie Zhang i wsp. [128] zaobserwowali bardziej nasilone uszkodzenie śródmiaższu u chorych z retinopatią.

## **6.6. Ograniczenia badania**

Przeprowadzone badanie ma kilka ograniczeń: przede wszystkim było to badanie przekrojowe, oznaczenia wybranych białek i badanie elektroforezy białek moczu przeprowadzono jednokrotnie, a ich wyniki oceniano w odniesieniu do wskaźników obecnie stosowanych w ocenie klinicznej pacjentów z T2DM. Ze względu na brak klinicznych wskazań i ze względu na inwazyjność badania nie zdecydowano się na weryfikację rozpoznania CChN za pomocą biopsji nerki. Wykluczono jedynie z badanej grupy chorych z rozpoznaniem nefropatii innej niż cukrzycowa. Dodatkowo, część badań nie była wykonana u wszystkich chorych. Ograniczenia te sprawiają, że wnioski z badania nie mogą być

traktowane jako definitywne i wskazana jest ich weryfikacja, najlepiej w badaniach prospektywnych, z udziałem większej liczby chorych.

## 7. WNIOSKI I IMPLIKACJE PRAKTYCZNE

Poszukiwania nowych, dostępnych narzędzi diagnostycznych, podobnie jak weryfikacja już istniejących, wydaje się mieć szczególne duże znaczenie w dobie stale wzrastającego odsetka chorych z cukrzycą, wymagających leczenia nerkozastępczego z powodu CChN. W oparciu o uzyskane w pracy wyniki badań, autorka uważa również, że rutynowe oznaczanie wybranych białek specyficznych w surowicy i moczu oraz wprowadzenie do panelu badań kontrolnych badania elektroforezy SDS-PAGE białek moczu w diagnostyce CChN u chorych z T2DM może pozwolić na większe zróżnicowanie tej heterogennej grupy chorych, a to może przyczynić się w z czasem do wdrożenia bardziej adekwatnej/lepszej terapii przyczynowej, ukierunkowanej na leczenie tubulopatii lub glomerulopatii cukrzycowej.

Wyniki uzyskane przez autorkę wpisują się ponadto w międzynarodową dyskusję nad możliwością nieinwazyjnych metod diagnostyki chorób nerek, w tym przypadku CChN, z pominięciem pozostającej złotym standardem w diagnostyce chorób nerek, biopsji gruboigłowej. Walidacja uzyskanych wyników z czasem trwania T2DM, stopniem wyrównania cukrzycy (ocena z użyciem hemoglobiny glikowanej, HbA<sub>1c</sub>), oraz obecnością zaburzeń metabolicznych (lipidogram, kwas moczowy) i zmian zapalnych pozwoli także na ocenę możliwości zastosowania badanych biopskaźników w monitorowaniu wpływu leczenia klasycznych zaburzeń współistniejących z T2DM na funkcję nerek badanych chorych.

Wprowadzenie do panelu badań systemowych oznaczania elektroforezy białek moczu w diagnostyce CChN, mogłoby w istotnym stopniu uzupełnić diagnostykę oraz dać klinicyście proste oraz tanie narzędzie dostępne w większości laboratoriów, bez konieczności stosowania skomplikowanych technik niezbędnych do jakościowej oceny białkomoczu, co obecnie przysparza wiele trudności w codziennej praktyce.

Na przykładzie oznaczeń cystatyny C w surowicy, autorka postuluje również ponowne zainteresowanie się i wykorzystywanie w diagnostyce chorych z T2DM, parametrów o udowodnionej już wysokiej przydatności we wczesnej ocenie rozwijających się powikłań, w tym powikłań sercowo-naczyniowych.

## Wnioski

1. Autorka pragnie uwypuklić wagę problemu jaki stanowi rozwijająca się CChN w grupie pacjentów z T2DM. Mimo dobrego wyrównania cukrzycy u większości pacjentów, w badanej grupie obserwowano wykładniki uszkodzenia nerek, podczas, gdy jedynie pacjenci z białkomoczem kłębuszkowym charakteryzowali się znamienne wyższymi stężeniami HbA<sub>1c</sub>.
2. W badanej grupie chorych z T2DM uszkodzenie cewek nerkowych wydaje się towarzyszyć uszkodzeniu kłębuszków. W elektroforezie białek moczu nie obserwowano typowych białkomoczu cewkowych (jedynie mieszane cewkowo-śródmiaższowe), a podwyższone stężenia markerów uszkodzenia cewek nerkowych (uNGAL, uKIM-1, uL-FABP) towarzyszyły albuminurii.
3. U części pacjentów z uACR <30 mg/g obserwowano podwyższone stężenia białek specyficznych w moczu (transferyna, IgG, KIM-1, NGAL), co wskazuje na możliwość wcześniejszego diagnozowania uszkodzenia nerek z wykorzystaniem markerów innych niż dotychczas stosowane (uACR, eGFR w oparciu o stężenie kreatyniny). W przypadku transferyny, IgG oraz NGAL w moczu dostępne są rutynowo stosowane, w pełni zautomatyzowane i zwalidowane metody laboratoryjne, wraz z wyznaczonym zakresem wartości referencyjnych. W celu potwierdzenia wartości diagnostycznej dodatkowych markerów (uKIM-1, L-FABP) w ocenie progresji CChN, autorka widzi potrzebę prowadzenia dalszych badań w większej grupie chorych.
4. Cystatyna C w surowicy wydaje się wcześniejszym od kreatyniny wskaźnikiem pogorszenia funkcji nerek u chorych z T2DM. Koreluje przy tym z umiarkowanie nasiloną albuminurią oraz z analizowanymi wskaźnikami stanu zapalnego.
5. Analiza wyników oznaczeń cystatyny C i uPAR w surowicy oraz uromoduliny moczu pozwala na wyodrębnienie pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych u chorych z T2DM. Wprowadzenie rutynowych oznaczeń cystatyny C do panelu badań kontrolnych w tej grupie chorych mogłoby długofalowo odnieść skutek w postaci obniżenia liczby rozwijających się powikłań sercowo-naczyniowych, jednak weryfikacja tej hipotezy wymaga dalszych badań.

## 8. PIŚMIENICTWO

1. Myśliwiec M. (red.) Wielka interna – nefrologia. Medical Tribune Polska; Warszawa 2017.
2. Perkowska-Ptasinska A., Bartczak A., Wagrowska-Danilewicz M. i wsp. Clinicopathologic correlations of renal pathology in the adult population of Poland. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2017; 32: 209–218.
3. Tervaert T.W., Mooyaart A.L., Amann K. i wsp. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21: 556-563.
4. Robles N.R., Villa J., Gallego R.H. Non-Proteinuric Diabetic Nephropathy. *J. Clin. Med.* 2015; 4: 1761-1773.
5. Krolewski A.S. Progressive Renal Decline: The New Paradigm of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2015; 38: 954-962.
6. MacIsaac R.J., Tsalamandris C., Panagiotopoulos S. i wsp. Nonalbuminuric renal insufficiency in Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 195–200.
7. Garg A.X., Kiberd B.A., Clark W.F. i wsp. Albuminuria and renal insufficiency prevalence guides population screening: Results from the NHANES III. *Kidney Int.* 2002; 61: 2165–2175.
8. Thomas M.C., Macisaac R.J., Jerums G. i wsp. Nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetic patients and in the general population (national evaluation of the frequency of renal impairment co-existing with NIDDM [NEFRON] 11). *Diabetes Care* 2009; 32: 1497–1502.
9. Dalla Vestra M., Saller A., Bortoloso E. i wsp. Structural involvement in Type 1 and Type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab.* 2000; 26 (Suppl. 4): 8–14.
10. Fioretto P., Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.* 2007; 27: 195–207.
11. Fioretto P., Caramori M.L., Mauer M. The kidney in diabetes: dynamic pathways of injury and repair. The Camillo Golgi Lecture 2007. *Diabetologia* 2008; 51: 1347-1355.
12. Gaede P., Tarnow L., Vedel P. i wsp. Remission to normoalbuminuria during multifactorial treatment preserves kidney function in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004; 19: 2784-2788

13. Dalla Vestra M., Masiero A., Roiter A.M. i wsp. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52: 1031-1035.
14. Gall M.A., Rossing P., Skøtt P. i wsp. Prevalence of micro- and macroalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and large vessel disease in European type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1991; 34: 655–661.
15. Penno G., Solini A., Zoppini G. i wsp. Rate and determinants of association between advanced retinopathy and chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes: the Renal Insufficiency And Cardiovascular Events (RIACE) Italian multicenter study. *Diabetes Care*. 2012; 35: 2317-2323.
16. MacIsaac R.J., Tsalamandris C., Panagiotopoulos S. i wsp. Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27: 195-200.
17. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę typu 2. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Kliniczna*. 2017; 3 (supl. A).
18. Rabelink T.J., de Zeeuw D. The glycocalyx--linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat. Rev. Nephrol*. 2015; 11: 667-676.
19. MacIsaac R.J., Ekinci E.I., Jerums G.: Progressive diabetic nephropathy. How useful is microalbuminuria? *contra*. *Kidney Int*. 2014; 86: 50-7.
20. Newman D.J., Mattock M.B., Dawney A.B. i wsp. Systematic review on urine albumin testing for early detection of diabetic complications. *Health Technol Assess*. 2005; 9 (30).
21. Yamada T., Komatsu M., Komiya I. i wsp. Development, progression, and regression of microalbuminuria in Japanese patients with type 2 diabetes under tight glycaemic and blood pressure control: the Kashiwa study. *Diabetes Care* 2005; 28: 2733-2738.
22. Steinke J.M., Sinaiko A.R., Kramer M.S. i wsp. The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: III. Predictors of 5-year urinary albumin excretion rate patterns in initially normoalbuminuric patients. *Diabetes* 2005; 54: 2164-2171.
23. Grubb A.O. Cystatin C – properties and use as a diagnostic marker. *Adv. Clin. Chem*. 2000; 35: 63-99.
24. Westhuyzen J. Review: Cystatin C: a promising marker and predictor of impaired renal function. *Ann. Clin. Lab. Sci. Autumn*. 2006; 36: 387-94.



25. D'Sa J., Shetty S., Bhandary R.R., Rao A.V. Association Between Serum Cystatin C and Creatinine in Chronic Kidney Disease Subjects Attending a Tertiary Health Care Centre. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11: BC09-BC12.
26. Ravn B., Prowle J.R., Mårtensson J. i wsp. Superiority of Serum Cystatin C Over Creatinine in Prediction of Long-Term Prognosis at Discharge From ICU. *Crit. Care Med.* 2017; 45: e932-e940.
27. Suzuki Y., Matsushita K., Seimiya M. i wsp. Serum cystatin C as a marker for early detection of chronic kidney disease and grade 2 nephropathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012; 50: 1833-1839.
28. Bleyer A.J., Kmoch S. Tamm Horsfall Glycoprotein and Uromodulin: It Is All about the Tubules! *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11: 6-8.
29. Miśkiewicz A., Więcek A. Autosomalnie dominujące cewkowo-śródmiaższowe choroby nerek – ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń związanych z mutacją w genie kodującym uromodulinę. *Nefrol. Dial. Pol.* 2015; 19, 166-169.
30. Pruijm M., Ponte B., Ackermann D. i wsp. Associations of Urinary Uromodulin with Clinical Characteristics and Markers of Tubular Function in the General Population. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11: 70-80.
31. Troyanov S., Delmas-Frenette C., Bollée G. i wsp. Clinical, Genetic, and Urinary Factors Associated with Uromodulin Excretion. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11: 62-69.
32. Currie G., McKay G., Delles C. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future. *World J. Diabetes.* 2014; 5: 763-776.
33. Nielsen S.E., Andersen S., Zdunek D. i wsp. Tubular markers do not predict the decline in glomerular filtration rate in type 1 diabetic patients with overt nephropathy. *Kidney Int.* 2011; 79: 1113-1118.
34. Nielsen S.E., Schjoedt K.J., Astrup A.S. i wsp. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule 1 (KIM-1) in patients with diabetic nephropathy: a cross sectional study and the effects of lisinopril. *Diabet Med.* 2010; 27: 1144-1115.
35. Fu W.J., Li B.L., Wang S.B. i wsp. Changes of the tubular markers in type 2 diabetes mellitus with glomerular hyperfiltration. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012; 95: 105-109.
36. Conway B.R., Manoharan D., Manoharan D. i wsp. Measuring urinary tubular biomarkers in type 2 diabetes does not add prognostic value beyond established risk factors. *Kidney Int.* 2012; 82: 812-818.

37. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* 2013; 3: 1-150.
38. Nowak N., Skupien J., Niewczas M.A. i wsp. Increased plasma kidney injury molecule-1 suggests early progressive renal decline in non-proteinuric patients with type 1 diabetes. *Kidney Int.* 2016; 89: 459-467.
39. Vaidya V.S., Niewczas M.A., Ficociello L.H. i wsp. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase. *Kidney Int.* 2011; 79: 464-470.
40. McCormick C.P., Konen J.C., Shihabi Z.K. Microtransferrinuria and microalbuminuria in the diabetic human. *Clin. Physiol. Biochem.* 1990; 8: 53-8.
41. Kanauchi M., Akai Y., Hashimoto T. Transferrinuria in type 2 diabetic patients with early nephropathy and tubulointerstitial injury. *Eur. J. Intern. Med.* 2002; 13: 190-193.
42. Narita T., Hosoba M., Kakei M., Ito S. Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006; 29: 142-144.
43. Sasaki A., Oikawa S., Toyota T. Microalbuminuria is closely related to diabetic macroangiopathy. *Diabetes Res. Clin. Practice.* 1999; 44: 35-40.
44. Yaqoob M., McClelland P., Patrick A.W. i wsp. Tubulopathy with macroalbuminuria due to diabetic nephropathy and primary glomerulonephritis. *Kidney Int. Suppl.* 1994; 47: S101-S104.
45. Yaqoob M., McClelland P., Patrick A.W. i wsp. Tubular damage in microalbuminuric patients with primary glomerulonephritis and diabetic nephropathy. *Ren. Fail.* 1995; 17: 43-49.
46. Bolignano D., Donato V., Coppolino G. i wsp. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am. J. Kidney Dis.* 2008; 52: 595-605.
47. Yang Y.H., He X.J., Chen S.R. i wsp. Changes of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in type-2 diabetic patients with nephropathy: one-year observational follow-up study. *Endocrine.* 2009; 36: 45-51.
48. Bolignano D., Lacquaniti A., Coppolino G. i wsp. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press. Res.* 2009; 32: 91-99.

49. Gala-Błądzińska A., Żyłka A., Rybak K. i wsp. Usefulness of measuring urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and calculating NGAL to creatinine ratio as early markers of kidney dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diagn. Lab.* 2015; 51: 1-8.
50. Orlando R.A., Rader K., Authier F. i wsp. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998; 9: 1759-1766.
51. Mise K., Hoshino J., Ueno T. i wsp. Prognostic Value of Tubulointerstitial Lesions, Urinary N-Acetyl- $\beta$ -d-Glucosaminidase, and Urinary  $\beta$ 2-Microglobulin in Patients with Type 2 Diabetes and Biopsy-Proven Diabetic Nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11: 593-601.
52. Yoshikawa R., Wada J., Seiki K. i wsp. Urinary PGDS levels are associated with vascular injury in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2007; 76: 358-367.
53. Kamijo-Ikemori A., Sugaya T., Ichikawa D. i wsp. Urinary liver type fatty acid binding protein in diabetic nephropathy. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 424: 104-108.
54. Suzuki K., Babazono T., Murata H., Iwamoto Y. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2005; 28: 2038-2039.
55. Kamijo-Ikemori A., Sugaya T., Yasuda T. i wsp. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in diabetic nephropathy of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2011; 34: 691-696.
56. Araki S., Haneda M., Koya D. i wsp. Predictive effects of urinary liver-type fatty acid-binding protein for deteriorating renal function and incidence of cardiovascular disease in type 2 diabetic patients without advanced nephropathy. *Diabetes Care.* 2013; 36: 1248-1253.
57. Blasi F., Carmeliet P. uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 932-943.
58. Plesner T., Behrendt N., Ploug M. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells* 1997; 15: 398-408.
59. Toldi G., Bekő G., Kádár G. i wsp. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in the assessment of inflammatory activity of rheumatoid arthritis patients in remission. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51: 327-332.

60. Guthoff M., Wagner R., Randrianarisoa E. i wsp. Soluble urokinase receptor (suPAR) predicts microalbuminuria in patients at risk for type 2 diabetes mellitus. *Sci. Rep.* 2017; 7: 40627.
61. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 2006; 69: 562-573.
62. Li S.Y., Huang P.H., Yang A.H. i wsp. Matrix metalloproteinase-9 deficiency attenuates diabetic nephropathy by modulation of podocyte functions and dedifferentiation. *Kidney Int.* 2014; 86: 358-369.
63. Yashima I., Hirayama T., Shiiki H. i wsp. Diagnostic Significance of Urinary Immunoglobulin G in Diabetic Nephropathy. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.* 1999; 41: 787-796.
64. Donderski R., Bednarski K., Manitius J. Białkomocz a postęp przewlekłej choroby nerek Czy rodzaj wydalanych białek może wpływać na przebieg przewlekłej choroby nerek? *Diabetologia Praktyczna* 2006; 7: 194-199.
65. Bazzi C., Petrini C., Rizza V. i wsp. A modern approach to selectivity of proteinuria and tubulointestinal damage in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2000; 58: 1732-1741.
66. Woo K.T., Lau Y.K., Lee G.S.L. i wsp. Pattern of proteinuria in IgA nephritis by SDS-PAGE: Clinical significance. *Clin Nephrol.* 1991; 36: 6-11.
67. Fioretto P., Mauer M., Brocco E. i wsp. Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria. *Diabetologia.* 1996; 39: 1569-1576.
68. Yamanouchi M., Furuichi K., Hoshino J. i wsp. Nonproteinuric Versus Proteinuric Phenotypes in Diabetic Kidney Disease: A Propensity Score-Matched Analysis of a Nationwide, Biopsy-Based Cohort Study. *Diabetes Care.* 2019; 42: 891-902.
69. Zoja C., Morigi M., Figlizzuzzi M. i wsp. Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am. J. Kidney Dis.* 1995; 26: 934-941.
70. Zeni L., Norden A.G.W., Cancarini G., Unwin R.J. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J. Nephrol.* 2017; 30: 701-717.
71. Gibb D.M., Tomlinson P.A., Dalton M.R. i wsp. Renal tubular proteinuria and microalbuminuria in diabetic patients. *Arch. Dis. Childhood.* 1989; 64: 129-134.
72. Tojo A., Onozato M., Ha H. i wsp. Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochem. Cell Biol.*, 2001; 116: 269-276.
73. Russo L.M., Sandoval R.M., Campos S.B. i wsp. Impaired Tubular Uptake Explains Albuminuria in Early Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20: 489-494.

74. Dickson L.E., Wagner M.C., Sandoval R.M. i wsp. The Proximal Tubule and Albuminuria: Really! *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 25: 443-453.
75. Yang L., Brooks C.R., Xiao S. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J. Clin. Invest.* 2015; 125: 1620-1636.
76. Garimella P.S., Biggs M.L, Katz R. Urinary uromodulin, kidney function, and cardiovascular disease in elderly adults. *Kidney Int.* 2015; 88: 1126-1134.
77. Cheung C.K., Cockram C.S., Yeung V.T. i wsp. Urinary excretion of transferrin by non-insulin-dependent diabetics: a marker for early complications? *Clin. Chem.* 1989; 35: 1672-1674.
78. Kazumi T., Hozumi T., Ishida Y. i wsp. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999; 22: 1176-1180.
79. Ellis D., Becker D., Daneman D. i wsp. Proteinuria in children with insulin-dependent diabetes: Relationship to duration of disease, metabolic control, and retinal changes. *J. Pediatrics,* 1983;102: 673-680.
80. Cai J., Jiao X., Luo W. i wsp Kidney injury molecule-1 expression predicts structural damage and outcome in histological acute tubular injury. *Ren. Failure.* 2019; 41: 80-87.
81. Krolewski A.S., Skupien J., Rossing P. i wsp. Fast renal decline to end-stage renal disease: an unrecognized feature of nephropathy in diabetes. *Kidney Int.* 2017; 91: 1300-1311.
82. Vistisen D., Andersen G.S., Hulman, A. i wsp. Progressive Decline in Estimated Glomerular Filtration Rate in Patients with Diabetes After Moderate Loss in Kidney Function – Even Without Albuminuria. *Diabetes Care.* 2019; 42: 1886-1894.
83. Derose S.F., Rutkowski M.P., Crooks P.W. i wsp. Racial Differences in Estimated GFR Decline, ESRD, and Mortality in an Integrated Health System. *Am. J. Kidney Dis.* 2013; 62: 236-244.
84. Baba M., Shimbo T., Horio M. i wsp. Longitudinal Study of the Decline in Renal Function in Healthy Subjects. *Plos ONE.* 2015; 10: e0129036.
85. Yang Y.-S., Peng C.-H., Lin C.-K. i wsp. Use of Serum Cystatin C to Detect Early Decline of Glomerular Filtration Rate in Type 2 Diabetes. *Int. Med.* 2007; 46: 801-806.

86. Brijesh M., Saurav P. Comparative Study of Significance of Serum Cystatin C, Serum Creatinine and Microalbuminuria Estimation in Patients of Early Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Metabol.* 2015; 6: 2.
87. Coll E., Botey A., Alvarez L. i wsp. Serum cystatin C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *Am. J. Kidney Dis.* 2000; 36: 29-34.
88. Jeon Y.K., Kim M.R., Huh J.E. i wsp. Cystatin C as an Early Biomarker of Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Korean Med. Sci.* 2011; 26: 258.
89. Peralta C.A., Shlipak M.G., Judd S. Detection of Chronic Kidney Disease with Creatinine, Cystatin C, and Urine Albumin-to-Creatinine Ratio and Association with Progression to End-Stage Renal Disease and Mortality. *JAMA.* 2011; 305: 1545.
90. Christensson A.G., Grubb A.O., Nilsson, J.-A. i wsp. Serum cystatin C advantageous compared with serum creatinine in the detection of mild but not severe diabetic nephropathy. *J. Int. Med.* 2004; 256: 510-518.
91. Okura T., Jotoku M., Irita J. i wsp. Association between cystatin C and inflammation in patients with essential hypertension. *Clin. Exp. Nephrol.* 2010; 14: 584-588.
92. Risch L., Lhotta K., Meier D. i wsp. The serum uromodulin level is associated with kidney function. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014; 52: 1755-1761.
93. Steubl D., Block M., Herbst V. i wsp. Urinary uromodulin independently predicts end-stage renal disease and rapid kidney function decline in a cohort of chronic kidney disease patients. *Medicine* 2019; 98: 21.
94. Leiherer A., Muendlein A., Saely i wsp. The value of uromodulin as a new serum marker to predict decline in renal function. *J. Hypertension.* 2018; 36: 110-118.
95. Micanovic R., LaFavers K., Garimella P.S. i wsp. Uromodulin (Tamm-Horsfall protein): guardian of urinary and systemic homeostasis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2020; 35: 33-43.
96. Maydan O., McDade P.G., Liu Y. i wsp. Uromodulin deficiency alters tubular injury and interstitial inflammation but not fibrosis in experimental obstructive nephropathy. *Physiol. Rep.* 2018; 6: e13654.
97. Bjornstad P., Snell-Bergeon J.-K., Lovshin J.A. i wsp. Elevated Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Intrarenal Hemodynamic Dysfunction in Type 1 Diabetes (T1D). *Diabetes.* 2018; 67(Suppl. 1): 520-P.
98. Mori K., Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int.* 2007; 71: 967-970.

99. Nowak N., Skupien J., Smiles A. i wsp. Markers of early progressive renal decline in type 2 diabetes suggest different implications for etiological studies and prognostic tests development. *Kidney Int.* 2018; 93: 1198-1206.
100. MacIsaac R.J., Ekinci E.I., Jerums G. Markers of and Risk Factors for the Development and Progression of Diabetic Kidney Disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2014; 63: S39-S62
101. Odden M.C., Tager I.B., Gansevoort R.T. i wsp. Age and cystatin C in healthy adults: a collaborative study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010; 25: 463-469.
102. Köttgen A., Selvin E., Stevens L.A. i wsp. Serum cystatin C in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am. J. Kidney Dis.* 2008; 51: 385-94.
103. Wada T., Nangaku M. A circulating permeability factor in focal segmental glomerulosclerosis: the hunt continues. *Clin. Kidney J.* 2015; 8: 708-715.
104. Ishimura S., Furuhashi M., Watanabe Y. i wsp. Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS ONE.* 2013; 8: e81318.
105. Genuth S., Eastman R., Kahn R. i wsp. Implications of the United Kingdom prospective diabetes study. *Diabetes Care.* 2003; 26 Suppl 1: S28-S32.
106. ADVANCE Collaborative Group, Patel A., MacMahon S. i wsp. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 2560-2572.
107. Krolewski A.S., Laffel L.M., Krolewski M. i wsp. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 1251-1255.
108. Jansson F.J., Forsblom C., Harjutsalo V. i wsp. Regression of albuminuria and its association with incident cardiovascular outcomes and mortality in type 1 diabetes: the FinnDiane Study. *Diabetologia.* 2018; 61: 1203-1211.
109. DCCT/EDIC Research Group, de Boer I.H., Sun W. i wsp. Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 2366-2376.
110. Perkovic V., Heerspink H.L., Chalmers J. i wsp. Intensive glucose control improves kidney outcomes in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2013; 83: 517-523.

111. Skupien J., Warram J.H., Smiles A.M. i wsp. The early decline in renal function in patients with type 1 diabetes and proteinuria predicts the risk of end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2012; 82: 589-597.
112. Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 98-107.
113. Wolkow P.P., Niewczas M.A., Perkins B. i wsp. Association of urinary inflammatory markers and renal decline in microalbuminuric type 1 diabetics. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19: 789-797.
114. Morton J., Zoungas S., Li Q. i wsp. Low HDL cholesterol and the risk of diabetic nephropathy and retinopathy: results of the ADVANCE study. *Diabetes Care.* 2012; 35: 2201-2206.
115. Jenkins A.J., Lyons T.J., Zheng D. i wsp. Lipoproteins in the DCCT/EDIC cohort: associations with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2003; 64: 817-828.
116. Ficociello L.H., Perkins B.A., Silva K.H. et al. Determinants of progression from microalbuminuria to proteinuria in patients who have type 1 diabetes and are treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 2: 461-469.
117. Carlsson A.C., Larsson A., Helmersson-Karlqvist J. i wsp. Urinary kidney injury molecule-1 and the risk of cardiovascular mortality in elderly men. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 9: 1393-1401.
118. Leihner A., Muendlein A., Saely C.H. i wsp. Serum uromodulin is a predictive biomarker for cardiovascular events and overall mortality in coronary patients. *Int. J. Cardiol.* 2017; 231: 6-12.
119. Lassus J., Harjola V.P., Sund R. i wsp. Prognostic value of cystatin C in acute heart failure in relation to other markers of renal function and NT-proBNP. *Eur. Heart J.* 2007; 28: 1841-1847.
120. Salgado J.V., Souza F.L., Salgado B.J. How to understand the association between cystatin C levels and cardiovascular disease: Imbalance, counterbalance, or consequence? *J. Cardiol.* 2013; 62: 331-335.
121. Dent T.H. Predicting the risk of coronary heart disease. II: the role of novel molecular biomarkers and genetics in estimating risk, and the future of risk prediction. *Atherosclerosis.* 2010; 213: 352-362.



122. Urbonaviciene G., Shi G.P., Urbonavicius S. i wsp. Higher cystatin C level predicts long-term mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 2011; 216: 440-445.
123. Woitas R.P., Scharnagl H., Kleber M.E. i wsp. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels are U-shaped in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study-Impact for mortality. *PLoS One*. 2017; 12: e0171574.
124. Hodges G.W., Bang C.N., Wachtell K. i wsp. suPAR: A New Biomarker for Cardiovascular Disease? *Can. J. Cardiol*. 2015; 31: 1293-1302.
125. Lyngbæk S., Sehestedt T., Marott J.L. i wsp. CRP and suPAR are differently related to anthropometry and subclinical organ damage. *Int. J. Cardiol*. 2013; 167: 781-785.
126. Sørensen M.H., Gerke O., Eugen-Olsen J. i wsp. Soluble urokinase plasminogen activator receptor is in contrast to high-sensitive C-reactive-protein associated with coronary artery calcifications in healthy middle-aged subjects. *Atherosclerosis*. 2014; 237: 60-66.
127. Rodríguez-Poncelas A., Mundet-Tudurí X., Miravet-Jiménez S. i wsp. Chronic Kidney Disease and Diabetic Retinopathy in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2016; 11: e0149448.
128. Zhang J., Wang Y., Li L. et al. Diabetic retinopathy may predict the renal outcomes of patients with diabetic nephropathy. *Ren Fail*. 2018; 40: 243-251.

## 9. STRESZCZENIE

Cukrzycowa choroba nerek (CChN) stanowi najczęstszą przyczynę schyłkowej niewydolności nerek w Polsce. Etiologię przewlekłej choroby nerek można przypisywać cukrzycy, jeśli u chorego stwierdza się zwiększone wydalanie albuminy z moczem, któremu może towarzyszyć utrata funkcji filtracyjnej nerek. Jednak u części chorych utrata funkcji filtracyjnej nie jest poprzedzona wzrostem albuminurii. W związku z tym poszukuje się innych markerów laboratoryjnych wczesnej CChN.

Celem badania była analiza użyteczności diagnostycznej wybranych białek specyficznych oznaczanych w surowicy i moczu oraz badania elektroforezy białek moczu w żelu poliakrylamidowym z użyciem siarczanu dodecylu sodu (SDS-PAGE) w diagnostyce cukrzycowej choroby nerek u chorych z cukrzycą typu 2 (T2DM).

Badaniem objęto grupę 117 dorosłych chorych z T2DM ze współczynnikiem albumina/kreatynina w moczu (uACR)  $<300$  mg/g i wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej szacowanym w oparciu o stężenie kreatyniny (eGFR)  $>30$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Oznaczono szeroki panel białek specyficznych w moczu: cząsteczkę uszkodzenia nerek-1 (uKIM-1), lipokalinę związaną z żelatynazą neutrofilii (uNGAL), wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (uL-FABP), transferynę (uTRF),  $\beta$ 2-mikroglobulinę, immunoglobulinę G (uIgG) i uromodulinę (uUMOD) oraz wybrane białka surowicy: cystatynę C (sCysC), uromodulinę (sUMOD), rozpuszczalny receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPAR), sNGAL i metaloproteinazę 9 macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-9). Stężenia białek specyficznych w moczu oceniano także po uwzględnieniu stężenia kreatyniny w moczu (uCr). Wyniki elektroforezy białek moczu i stężenia białek specyficznych oceniano w odniesieniu do uznanych markerów uszkodzenia nerek wykorzystywanych w praktyce klinicznej: stężenia kreatyniny w surowicy i eGFR oraz uACR. Oceniono zależności składu białek moczu i stężeń badanych białek surowicy od wieku, płci, czasu trwania T2DM, stopnia wyrównania cukrzycy (hemoglobina glikowana, HbA<sub>1c</sub>), zmian zapalnych (białko C-reaktywne, CRP), obecności zaburzeń metabolicznych (lipidogram, kwas moczowy), powikłań sercowo-naczyniowych i retinopatii cukrzycowej.

W badanej grupie większość stanowili chorzy z dobrze kontrolowaną cukrzycą (HbA<sub>1c</sub>  $\leq 7\%$  u ok. 60% pacjentów), eGFR  $>60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> (87%) i uACR  $<30$  mg/g (prawie 80% pacjentów). Mediana czasu od rozpoznania T2DM wynosiła 6 lat (12% chorych ze świeżo

wykrytą cukrzycą). Wyniki elektroforezy białek moczu były dobrze skorelowane z oceną albuminurii (stężeniem albuminy w moczu i wartością uACR). U części chorych wykazano obecność białkomoczu kłębuszkowego (selektywnego i nieselektywnego) oraz białkomocz cewkowo-kłębuszkowy, nie obserwowano izolowanego białkomoczu cewkowego. Wykazano szereg związków między nasileniem albuminurii i rodzajem białkomoczu a stężeniami białek specyficznych w moczu chorych (uKIM-1, uNGAL, uIgG i uTRF, słabsze związki z uUMOD i uL-FABP). Dodatkowo obserwowano dodatnie korelacje między uACR a stężeniem sCysC i uPAR w surowicy chorych. W ocenie wyników elektroforezy białek moczu zwrócono uwagę na obecność prążka uromoduliny (białka Tamma-Horsfalla) u ok. 1/3 badanych pacjentów, najczęściej ze śladową albuminurią. W tej podgrupie pacjentów obserwowano także wyższe stężenia uUMOD mierzone metodą immunoenzymatyczną. Chorzy ci charakteryzowali się niższymi stężeniami sNGAL i uPAR w surowicy oraz niższymi stężeniami białek specyficznych w moczu (uIgG, uKIM-1 i uL-FABP/uCr).

W badanej grupie obserwowano nieliczne związki ocenianych markerów biochemicznych z wiekiem chorych (sCysC, sUMOD, uPAR i uL-FABP) i czasem trwania cukrzycy (uIgG). Obserwowano zależności między stopniem wyrównania cukrzycy a rodzajem białkomoczu w ocenie elektroforetycznej, eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>), stężeniem uPAR w surowicy i stężeniami białek w moczu: uNGAL, uKIM-1, uIgG i uTRF. Stężenia sCysC, uPAR i sNGAL w surowicy oraz uIgG i uTRF w moczu skorelowane były ze stężeniem CRP w surowicy, przy czym należy zaznaczyć, że u badanych pacjentów nie obserwowano nasilonej reakcji zapalnej (mediana CRP wynosiła 3 mg/l). Wykazano szereg korelacji badanych białek specyficznych (sCysC, uPAR, sUMOD i sNGAL w surowicy; uKIM-1, uUMOD i uL-FABP w moczu) z nasileniem dyslipidemii.

Oznaczone w pracy markery wykazują nieprawidłowości u części chorych z uACR <30 mg/g i eGFR >60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, co może pozwolić na diagnozowanie CChN na wczesnym etapie. Oznaczenia cystatyny C, uromoduliny i uPAR w surowicy chorych z T2DM mogłoby umożliwić wyodrębnienie chorych z grupy zwiększonego ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Wyniki pracy powinny jednak zostać zweryfikowane w badaniach prospektywnych, z udziałem większej liczby chorych.

## 10. ABSTRACT

Diabetic kidney disease (DKD) is the leading cause of end-stage renal failure in Poland. DKD is suspected among patients with increased albuminuria and associated decrease in glomerular filtration. However, there are DKD patients in whom glomerular filtration decreases without preceding increase in albuminuria. There is a need for other laboratory markers of early DKD than albuminuria.

The aim of the study was the analysis of diagnostic utility of selected specific proteins measured in serum and urine and of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of urinary proteins in diagnostic approach to DKD developing in type 2 diabetes (T2DM).

The study included 117 adult patients with T2DM, with urine albumin/creatinine ratio (uACR) <30 mg/g and estimated glomerular filtration rate based on serum creatinine (eGFR) <60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. A wide panel of specific proteins was assessed including urinary kidney injury molecule-1 (uKIM-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL), liver-type fatty acid-binding protein (uL-FABP), transferrin (uTRF),  $\beta$ 2-microglobulin, immunoglobulin G (uIgG), uromodulin (uUMOD) and serum cystatin C (sCysC), uromodulin (sUMOD), soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), sNGAL and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). The concentrations of urinary proteins were also corrected for urine creatinine concentration (uCr). The results of urinary protein electrophoresis and the measured concentrations of specific proteins were assessed in relation to the markers presently used in clinical practice, i.e. serum creatinine concentration, resulting eGFR and uACR. Moreover, the associations were evaluated between the studied markers and age, sex, diabetes duration, diabetes control (glycated hemoglobin, HbA<sub>1c</sub>), inflammation (C-reactive protein, CRP), metabolic disorders (lipid profile, uric acid), cardiovascular complications and retinopathy.

In the studied group, T2DM was well controlled in most patients (HbA<sub>1c</sub>  $\leq$ 7% in about 60%), eGFR was >60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> in 87% and uACR was <30 mg/g in almost 80% of patients. Median diabetes duration was 6 years, 12% of patients had newly diagnosed T2DM. SDS-PAGE results correlated well with urine albumin concentrations and uACR. In a part of the group, glomerular proteinuria (selective and non-selective) and mixed (tubular-glomerular) proteinuria were observed, but there were no cases of isolated tubular proteinuria. A number

of associations were observed between the level of albuminuria and the type of proteinuria and urinary proteins' concentrations (uKIM-1, uNGAL, uIgG i uTRF, uUMOD, uL-FABP). sCys C and uPAR positively correlated with uACR. The presence of uromodulin (Tamm-Horsfall protein) in urine protein electrophoresis was observed in about 1/3 of patients, mostly with trace albuminuria. This was confirmed by higher uUMOD measured using immunoenzymatic method. This subgroup of patients had lower sNGAL and uPAR in serum as well as lower uIgG, uKIM-1 and uL-FABP/uCr in urine.

Several studied proteins correlated with age (sCysC, sUMOD, uPAR and uL-FABP) and diabetes duration (uIgG). HbA<sub>1c</sub> was associated with type of proteinuria (as assessed by electrophoresis), eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>), serum uPAR, and urinary proteins: uNGAL, uKIM-1, uIgG and uTRF. sCysC, uPAR, sNGAL, uIgG and uTRF correlated positively with serum CRP, even though CRP concentrations were low in most patients (median 3 mg/l). sCysC, uPAR, sUMOD, sNGAL, uKIM-1, uUMOD and uL-FABP were associated with dyslipidemia.

The studied laboratory markers revealed abnormalities in patients with uACR <30 mg/g and eGFR >60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, possibly allowing for early diagnosis of DKD. Serum cystatin C, uromodulin and uPAR in T2DM patients may allow to distinct a subgroup with higher risk of cardiovascular complications. However, the results should be verified in larger prospective studies.

## 11. SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Badane wskaźniki oceniane w pojedynczej porannej porcji moczu wraz z wartościami referencyjnymi.....	25
<b>Tabela 2.</b> Zakres wartości referencyjnych dla parametrów morfologii krwi obwodowej.....	27
<b>Tabela 3.</b> Zakres wartości referencyjnych dla parametrów biochemicznych i immunochemicznych. ....	27
<b>Tabela 4.</b> Zakres wartości referencyjnych dla wybranych parametrów immunochemicznych. ....	29
<b>Tabela 5.</b> Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych z T2DM. ....	31
<b>Tabela 6.</b> Wyniki morfologii krwi obwodowej w badanej grupie chorych z T2DM. ....	33
<b>Tabela 7.</b> Wyniki badania ogólnego moczu w badanej grupie chorych z T2DM .....	34
<b>Tabela 8.</b> Wyniki badań biochemicznych w surowicy i moczu w badanej grupie z T2DM...	35
<b>Tabela 9.</b> Wyniki badań wybranych markerów w surowicy i w moczu w badanej grupie z T2DM.....	36
<b>Tabela 10.</b> Dane demograficzne w podgrupach chorych z T2DM utworzonych na podstawie uzyskanego wyniku elektroforezy białek moczu .....	38
<b>Tabela 11.</b> Porównanie parametrów morfologii krwi obwodowej pomiędzy badanymi podgrupami wyodrębnionymi na podstawie elektroforezy białek moczu .....	40
<b>Tabela 12.</b> Wyniki badania ogólnego moczu w podgrupach wyodrębnionych na podstawie elektroforezy białek.....	41
<b>Tabela 13</b> Porównanie wyników badań biochemicznych i podgrup wyodrębnionych na podstawie elektroforezy białek moczu.....	42
<b>Tabela 14.</b> Porównanie wskaźników uszkodzenia nerek w podgrupach wyodrębnionych na podstawie wyników elektroforezy białek moczu .....	44
<b>Tabela 15.</b> Istotne statystycznie różnice między podgrupami wyodrębnionymi ze względu na obecność prążka uromoduliny w badaniu elektroforezy białek moczu, dotyczące wyników badania morfologii krwi obwodowej, badań biochemicznych oraz wskaźników uszkodzenia nerek. ....	48
<b>Tabela 16.</b> Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych z T2DM podzielonych na podgrupy w zależności od wartości uACR .....	49
<b>Tabela 17.</b> Wyniki wybranych parametrów morfologii krwi obwodowej w podgrupach chorych wyodrębnionych w zależności od wartości uACR.....	49

<b>Tabela 18.</b> Wyniki badania ogólnego moczu w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od wartości wskaźnika uACR.....	50
<b>Tabela 19.</b> Wyniki badań biochemicznych w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od wartości uACR.....	50
<b>Tabela 20.</b> Wyniki badań markerów uszkodzenia nerek w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od wartości wskaźnika uACR.....	51
<b>Tabela 21</b> Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych z T2DM podzielonych na podgrupy w zależności od wartości eGFR (CKD-EPICr). .....	55
<b>Tabela 22.</b> Wyniki morfologii krwi obwodowej w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od eGFR (CKD-EPICr) .....	55
<b>Tabela 23.</b> Wyniki badania ogólnego moczu w podgrupach chorych z T2DM wyodrębnionych w zależności od wartości wskaźnika eGFR (CKD-EPICr) .....	56
<b>Tabela 24.</b> Porównanie wyników badań biochemicznych w podgrupach wyodrębnionych wśród badanych chorych T2DM w zależności od wartości wskaźnika eGFR (CKD-EPICr)..	57
<b>Tabela 25.</b> Porównanie wskaźników uszkodzenia nerek w podgrupach wyodrębnionych wśród badanych chorych z T2DM w zależności od wartości wskaźnika eGFR (CKD-EPICr) .....	58
<b>Tabela 26.</b> Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek z wiekiem pacjentów z T2DM, stopniem wyrównania cukrzycy wyrażonym stężeniem HbA1c oraz nasileniem stanu zapalnego wyrażonym stężeniem CRP .....	63
<b>Tabela 27.</b> Korelacje badanych wskaźników uszkodzenia nerek ze stężeniami cholesterolu LDL, HDL i trójglicerydów w surowicy pacjentów z T2DM.....	64
<b>Tabela 28.</b> Istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ ) wzajemne korelacje między badanymi wskaźnikami uszkodzenia nerek .....	65
<b>Tabela 29.</b> Istotnie statystycznie różnice dotyczące ocenianych wskaźników uszkodzenia nerek w grupie chorych z T2DM leczonych doustnymi lekami hipoglikemizującymi i wymagających leczenia insuliną .....	66

## 12. SPIS RYCIN

<b>Rycina 1.</b> Przykłady rozdziałów elektroforetycznych białek moczu.....	37
<b>Rycina 2.</b> Wiek , czas trwania T2DM , wartości eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ) oraz uACR w zależności od rodzaju białkomoczu wyodrębnionego na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu.	39
<b>Rycina 3.</b> Wartości HbA <sub>1c</sub> oraz stężenia albuminy w pojedynczej porcji moczu w zależności od rodzaju białkomoczu wyodrębnionego na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu.	43
<b>Rycina 4.</b> Stężenia uKIM-1 i uMOD oraz wartości wskaźników uKIM-1/uCr i uMOD/uCr w zależności od rodzaju białkomoczu wyodrębnionego na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu. ....	45
<b>Rycina 5.</b> Stężenia uNGAL , wartości wskaźnika uNGAL/Cr oraz stężenia IgG i transferyny w moczu pacjentów zależności od rodzaju białkomoczu wyodrębnionego na podstawie wyniku elektroforezy białek moczu .....	46
<b>Rycina 6.</b> Przykładowe rozdziały elektroforetyczne białek moczu z obecnością prążka uromoduliny (THP) i z niewykrywalną uromoduliną (BTHP).....	47
<b>Rycina 7.</b> Istotne statystycznie korelacje pomiędzy badanymi markerami uszkodzenia nerek: stężeniem NGAL w moczu , wskaźnikiem uNGAL/uCr , stężeniem KIM-1 w moczu oraz wskaźnikiem uKIM-1/uCr a wskaźnikiem uACR. ....	53
<b>Rycina 8.</b> Istotne statystycznie korelacje pomiędzy badanymi markerami uszkodzenia nerek: wskaźnikiem uL-FABP/uCr, stężeniem uPAR w surowicy oraz stężeniami IgG i transferyny w moczu a wskaźnikiem uACR.....	54
<b>Rycina 9</b> Istotne statystycznie korelacje pomiędzy badanymi markerami uszkodzenia nerek: stężeniami KIM-1 w moczu , uPAR i cystatyny C w surowicy oraz eGFR oszacowanym w oparciu o stężenie cystatyny C w surowicy a eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ).....	59
<b>Rycina 10.</b> Istotne statystycznie korelacje pomiędzy badanymi markerami uszkodzenia nerek: stężeniami UMOD , NGAL i uPAR w surowicy oraz stężeniami IgG i transferyny w moczu a eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ). ....	61
<b>Rycina 11.</b> Istotne statystycznie różnice między chorymi z rozpoznąną retinopatią cukrzycową a chorymi bez retinopatii dotyczące glikemii, wskaźnika uMOD/uCr oraz stężeń L-FABP w moczu .....	67
<b>Rycina 12</b> Istotne statystycznie różnice między chorymi z rozpoznanymi chorobami sercowo-naczyniowymi (CV) a chorymi bez powikłań sercowo-naczyniowych dotyczące wieku i czasu trwania cukrzycy.....	68



**Rycina 13.** Istotne statystycznie różnice między chorymi z rozpoznanymi chorobami sercowo-naczyniowymi (CV) a chorymi bez powikłań sercowo-naczyniowych dotyczące wskaźnika filtracji kłębuszkowej oszacowanego w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy i stężenie cystatyny C w surowicy , wskaźnika uACR oraz stężenia trójglicerydów w surowicy . ..... 69

**Rycina 14.** Istotne statystycznie różnice między chorymi z rozpoznanymi chorobami sercowo-naczyniowymi (CV) a chorymi bez powikłań sercowo-naczyniowych dotyczące stężenia NGAL w moczu, wskaźnika uKIM-1/uCr oraz stężeń uPAR , uromoduliny i cystatyny C w surowicy..... 70