

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Agnieszka Żyłka

**Role of new markers of nephropathy associated with diabetes mellitus type 2**

**Znaczenie wybranych markerów uszkodzenia nerek u chorych  
z cukrzycą typu 2**

*Praca doktorska*

Promotor pracy doktorskiej: dr hab. n. med. Beata Kuśnierz-Cabala, prof. UJ  
Promotor pomocniczy: dr n. med. Agnieszka Gala-Błędzińska

Pracę wykonano w Zakładzie Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej  
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bogdan Solnica

oraz w Poradni Nefrologicznej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2  
im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie

Kraków, 2018

*Składam serdeczne podziękowania:*

*Pani Profesor Beacie Kuśnierz-Cabali  
za życzliwość i wyrozumiałość  
oraz nieocenioną pomoc na każdym etapie powstawania pracy*

*Pani Doktor Agnieszce Gali-Błędzińskiej  
za inspirację, motywację oraz merytoryczną opiekę*

*Pani Doktor Paulinie Dumnickiej  
za życzliwość i wsparcie*

*Panu Profesorowi Markowi Dedeckusowi  
za możliwość naukowego i zawodowego rozwoju*

## **Spis treści**

1. Nota informacyjna.....	4
2. Podsumowanie pracy doktorskiej w języku polskim.....	7
Wstęp.....	7
Cele pracy.....	11
Materiał i metody .....	12
Charakterystyka prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	15
Wnioski i implikacje praktyczne przeprowadzonego badania.....	21
3. Artykuł nr 1.....	24
4. Artykuł nr 2.....	38
5. Artykuł nr 3.....	46
6. Artykuł nr 4.....	56
7. Oświadczenia współautorów.....	70
8. Wykaz skrótów.....	83
9. Załącznik nr 1.....	84
10. Streszczenie.....	87
11.Summary.....	91

## **1. Nota informacyjna**

Niniejsza rozprawa doktorska autorstwa lek. Agnieszki Żylki pt. „Znaczenie wybranych markerów uszkodzenia nerek u chorych z cukrzycą typu 2” oparta jest o monotematyczny cykl artykułów, na który składają się łącznie 4 prace, w tym 3 prace oryginalne i 1 praca poglądowa, opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie PubMed oraz znajdujących się na liście Journal Citation Reports (Thomson Reuters).

Łączna wartość *Impact Factor* (IF) dla cyklu przedstawionych prac (według Thomas Reuters Journal Citation Reports 2017) wynosi 5,897 oraz 75 punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (według „listy A”).

Do cyklu artykułów składających się na rozprawę włączono następujące prace:

1. **Żylka A.**, Gala-Błędzińska A., Rybak K., Dumnicka P., Drożdż R., Kuśnierz-Cabala B.: Role of new biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. *Folia Med Cracov.* 2015; 55: 21-33. (MNiSW=10).
2. Gala-Błędzińska A., **Żylka A.**, Rybak K., Dumnicka P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Usefulness of measuring urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and calculating NGAL to creatinine ratio as early predictors of kidney dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diagn Lab.* 2015; 51: 97-104. (MNiSW=10).
3. **Żylka A.**, Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Dis Markers.* 2016; doi.org/10.1155/2016/8489543. (IF=2,348; MNiSW=25).

4. **Żyłka A.**, Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceronowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediat Inflamm.* 2018; doi.org/10.1155/2018/7659243. (IF=3,549; MNiSW=30).

Część wyników została dodatkowo przedstawiona w postaci 2 doniesień zjazdowych prezentowanych na następujących konferencjach:

1. Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., **Żyłka A.**, Kuśnierz-Cabala B., Kuźniewski M.: Urinary neutrophil-associated lipocalin as complementary to albumin biomarker of early stage diabetic kidney disease in type 2 diabetes. ASN Kidney Week 2015 Annual Meeting, San Diego, USA, 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> November, 2015 [FR-PO612].
2. Pater P., Dumnicka P., Gala-Błędzińska A., **Żyłka A.**, Kuśnierz-Cabala B., Drożdż R.: Urine electrophoresis suggests different mechanism of early renal impairment among patients with type 2 diabetes. The 4th Joint EFLM-UEMS Congress „Laboratory Medicine at the Clinical Interface”, Warsaw, Poland, 21<sup>th</sup>-24<sup>th</sup> September, 2016 [eA221].

*Zgoda Komisji Bioetycznej*

Projekt pracy doktorskiej posiadał zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie z dnia 19 września 2014 roku (Uchwała nr 70/2014/B).

*Źródła finansowania*

Badania przeprowadzone w ramach realizacji projektu pracy doktorskiej zostały w części sfinansowane ze środków własnych Autorki oraz częściowo z projektu badań statutowych nr K/ZDS/006347 UJ CM.

## **2. Podsumowanie pracy doktorskiej w języku polskim**

### **Wstęp**

Cukrzycowa choroba nerek (*DKD - diabetic kidney disease*) będąca przedmiotem badań podjętych w niniejszej pracy doktorskiej stanowi jedno z najczęstszych powikłań cukrzycy typu 2 (*DMt2 - diabetic kidney disease*) o charakterze mikroangiopatii oraz jedną z głównych przyczyn przewlekłej choroby nerek (*CKD - chronic kidney disease*) [1]. CKD definiowana jest jako utrzymujące się przez ponad trzy miesiące nieprawidłowości morfologiczne lub czynnościowe nerek lub przesączanie kłębuszkowe (*GFR - glomerular filtration rate*)  $<60 \text{ ml/min}/1,73\text{m}^2$  [2].

Według obowiązujących aktualnych kryteriów w celu rozpoznania DKD należy w pierwszej kolejności wykluczyć inne przyczyny CKD, a następnie udokumentować obecność albuminurii w oparciu o ocenę wartości wskaźnika albumina do kreatynina w moczu (*uACR - urinary albumin to creatinine ratio*)  $>30\text{mg/g}$  potwierzonej następnie w kolejnych (przynajmniej 2) badaniach wykonanych w ciągu 3-6 miesięcy obserwacji [3].

Pomimo postępu jaki dokonuje się w ostatnich latach w zakresie leczenia DMt2, jak na przykład włączenie do terapii leków inkretynowych, a w szczególności antagonistów receptora dla glukagonopodobnego peptydu-1 (*GLP-1 - glucagon-like peptide-1*), czy leków hamujących kotransporter sodowo-glukozowy (*SGLT-2 - sodium glucose cotransporter-2 inhibitors*) w cewkach proksymalnych nerek, DKD nadal pozostaje pierwszą przyczyną niewydolności nerek i konieczności rozpoczęcia terapii nerkozastępczej w krajach rozwiniętych [4].

Jedną z ważnych przyczyn takiej epidemiologii są: heterogenny przebieg kliniczny uszkodzenia nerek u chorych z DMt2 wynikający ze współistnienia

skorelowanych z DMt2 schorzeń w przebiegu zespołu metabolicznego oraz zbyt późne rozpoznanie DKD w fazie pojawiania się uszkodzeń narządowych [5].

DMt2 jest schorzeniem, które przez wiele lat bywa asymptomatyczne, stąd też wielu chorych pozostaje przez długi okres czasu bez odpowiedniego leczenia [6]. W początkowym okresie choroby dochodzi zwykle do hiperfiltracji w kłębuszkach nerkowych, co może fałszować rozpoznanie uszkodzenia nerek w przebiegu DMt2, natomiast przedłużająca się hiperfiltracja doprowadza do nieodwracalnego szkliwienia kłębuszków nerkowych, które w badaniu histopatologicznym opisujemy jako segmentowe stwardnienie kłębuszków nerkowych (*FSGS - focal segmental glomerulosclerosis*). Tymczasem, FSGS nierazko pojawia się u chorych z DMt2, jako wyraz współistniejącej otyłości, czy nadciśnienia tętniczego i wyprzedza na wiele lat objawowe stadium choroby [7].

Dostępne i zalecane przez Towarzystwa Nefrologiczne biowskańniki oceny funkcji nerek, jak estymacja przesączania kłębuszkowego (eGFR) oparta o pomiar kreatyniny w surowicy krwi oraz ocena albuminurii w pojedynczej porcji moczu pozostają złotym standardem w rozpoznaniu DKD [3], oceniając wybiórczo jedynie funkcję filtracyjną nerek.

W przebiegu przeprowadzonych prac badawczych w grupie chorych z DMt2 ocenie poddano zarówno biowskańniki uszkodzenia cewek nerkowych jak: lipokalinę związaną z żelatynazą neutrofilów (*NGAL - neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) w surowicy i w moczu, cząsteczkę uszkodzenia nerek-1 (*KIM-1 - kidney injury molecule-1*) w moczu, uromodulinę (*UMOD*) w surowicy i w moczu, jak również markery uszkodzenia kłębuszka nerkowego, tj. albuminurię, transferynę i immunoglobulinę G (IgG - immunoglobulin G) w moczu oraz cystatynę C w surowicy (*sCysC - cystatin C*) [8].

## Piśmiennictwo

1. *Collins A.J., Foley R.N., Herzog Ch. et al.*: United States Renal Data System 2012 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in United States. *Am J Kidney Dis.* 2013; 62: 1023-1230.
2. National Kidney Foundation: KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 update. *Am J Kidney Dis.* 2012; 60: 850-886. doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.07.005.
3. 2017 Guidelines on the management of diabetic patients. A position of Diabetes in Poland. *Clin Diabet.* 2017; 6 (Suppl A): A1-A80. doi.org/10.5603/DK.2017.0001.
4. *Narres M., Claessen H., Droste S. et al.*: The incidence of end-stage renal disease in the diabetic (compared to the nondiabetic) population: a systemic review. *PLoS One.* 2016; 11: e0147329. doi.org/10.1371/journal.pone.0147329.
5. *Duran-Perez E.G., Almeda-Valdes P., Cuevas-Ramos D., Campos-Barrera E., Muñoz-Hernandez L., Gomez-Perez F.J.*: Treatment of metabolic syndrome slows progression of diabetic nephropathy. *Metab Syndr Relat Disord.* 2011; 9: 483-489. doi.org/10.1089/met.2011.0056.
6. International Diabetes Federation. IFD Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015. <http://www.diabetesatlas.org>.
7. *Amann K., Benz K.*: Structural renal changes in obesity and diabetes. *Semin Nephrol.* 2013; 33: 23-33. doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.12.003.
8. *Currie G., McKay G., Delles C.*: Biomarkers in diabetic nephropathy: present and future. *World J Diabetes.* 2014; 5: 763-776. doi.org/10.4239/wjd.v5.i6.763.
9. Zaleczenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę typu 2 2015. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Clin Diabetol.* 2015; 4 (Suppl A): 1-73.

10. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. Am J Kidney Dis. 2007; 49 (Suppl 2): S12-154.

## Cele pracy

Przeprowadzono badania mające na celu ocenę przydatności diagnostycznej oznaczania biomarkerów wczesnego uszkodzenia nerek w stadium G1/A1 i G2/A1 w przebiegu DMt2.

W szczególności oceniono:

- użyteczność diagnostyczną oznaczeń uNGAL i wyliczanego wskaźnika uNGAL do kreatyniny w moczu (*uNCR - urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin to creatinine ratio*) w pierwszej porannej porcji moczu u pacjentów z DMt2, jako predyktorów wczesnego uszkodzenia cewek nefronu,
- zmiany stężenia uNGAL, albuminurii i uACR w czasie oraz wielkości wskaźnika uNCR oznaczanych w porannej porcji moczu po rocznej obserwacji, ze szczególnym uwzględnieniem progresji uszkodzenia nerek oraz oceny ryzyka wystąpienia schorzeń sercowo-naczyniowych (*CVD - cardiovascular diseases*) w badanej grupie chorych,
- zależności między zmianą stężeń (uACR, sNGAL, uNGAL, uNCR) w moczu, sCysC w surowicy, UMOD w surowicy i w moczu, wskaźnika uromodulina/kreatynina w moczu, transferyny, IgG, KIM-1 i wskaźnika KIM-1/kreatynina w moczu oraz czasem trwania i stopniem wyrównania cukrzycy ocenianym poprzez zmianę wielkości HbA<sub>1c</sub>,
- użyteczność diagnostyczną oznaczeń sNGAL w surowicy oraz uNGAL, uNCR, uKIM-1/kreatynina oraz IgG w moczu w prognozowaniu progresji uszkodzenia nerek ocenianą poprzez zmianę wartości eGFR oraz uACR po rocznej obserwacji chorych z DMt2,
- możliwość zastosowania wartości eGFR wyliczonych z wykorzystaniem wzoru z zastosowaniem sCysC (eGFR<sub>cys</sub>) w celu diagnostyki DKD w przedklinicznym stadium choroby.

## **Material i metody**

### *Grupa badana*

Do badań przeprowadzonych w pracy włączono pacjentów powyżej 18 roku życia z eGFR>60ml/min/1,73m<sup>2</sup>, bez cech jawnego białkomoczu, leczonych w Poradni Nefrologicznej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie z rozpoznaniem DMt2. Do kryteriów wyłączających zaliczono: brak świadomej zgody na udział w badaniu, stosowanie leków potencjalnie nefrotoksycznych, zakażenie dróg moczowych, zakażenie ogólnoustrojowe, choroby nowotworowe, choroby alergiczne, niedokrwistość, choroby tkanki łącznej oraz nieustabilizowane nadciśnienie tętnicze ( $\geq 140/90$  mmHg) w chwili kwalifikacji do badania. Liczebność poszczególnych grup opisano szczegółowo w kolejnych pracach. Najliczniejsza grupa obejmowała 115 pacjentów z rozpoznaniem DMt2.

### *Materiał badany*

W ramach badania u pacjentów zgłaszających się do Poradni Nefrologicznej wykonywano badania podstawowe, do których zaliczono pomiar stężenia glukozy w surowicy na czczo, poziom HbA<sub>1c</sub>, badanie morfologii krwi obwodowej z rozmazem, profil lipidowy, stężenie białka C reaktywnego (*CRP - C-reactive protein*), kreatyniny w surowicy wraz z wyliczeniem eGFR wg wzoru CKD-EPI oraz badanie ogólne moczu wraz z analizą osadu. W pierwszej porannej porcji moczu przeprowadzono pomiar stężenia NGAL oraz albuminy i kreatyniny, wyliczając następnie wskaźniki uACR oraz uNCR. Dodatkowo, próbówkę porannej porcji moczu zabezpieczono do dalszych badań. W celu przeprowadzenia dodatkowych badań zabezpieczono również surowicę oraz osocze cytrynianowe i wersenianowe. Rozporcjowane próbki o objętości 500 µL przechowywano w temperaturze -

-80°C do czasu zebrania pełnego kompletu. Badania przeprowadzano w seriach. W zabezpieczonym materiale przeprowadzono pomiary stężeń transferyny, IgG, uromoduliny, KIM-1 w moczu oraz CysC, NGAL i uromoduliny w surowicy.

### *Metody laboratoryjne*

Do badania ogólnego moczu wykorzystano analizator Labumat-Urised 2. Pomiar uNGAL wykonano przy użyciu techniki CMIA (chemiluminescent microparticle immunoassay) na analizatorze Architect Analyzer (firmy Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, USA). Stężenie albuminy w moczu zmierzono przy użyciu metody immunoturbidometrycznej, natomiast kreatyniny przy użyciu metody enzymatycznej na analizatorze Olympus/Beckman Coulter Chemistry Analyzer AU680 (Beckman Coulter, Brea, USA). Badanie morfologii krwi obwodowej z rozmazem przeprowadzono na analizatorze hematologicznym ADVIA 2120i firmy Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics, Germany). Pomiar stężenia transferyny, IgG i CysC wykonano przy użyciu metody immunonefelometrycznej na analizatorze Nephelometer II firmy Siemens (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Uromodulinę oraz KIM-1 oznaczono z wykorzystaniem techniki ELISA przy pomocy zestawów Human Uromodulin ELISA kit (BioVendor, Brno, Czech Republic) i Quantikine ELISA Human TIM-1/KIM-1/HAVCR Immunoassay (R&D Systems, McKinley Place, MN, USA). Stężenie NGAL w surowicy oznaczono przy użyciu zestawu Human Lipocalin-2/NGAL ELISA firmy BioVendor, Brno, Czech Republic. Odczyt wyników uzyskiwano w sposób automatyczny przy pomocy mikrofotometra Automatic Micro ELISA Reader ELX 808 (BIO-TEK® Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

Badania laboratoryjne wykorzystywane w rutynowej ocenie stanu pacjenta przeprowadzono w Laboratorium Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie. Pomiary stężenia transferyny

i IgG w moczu oraz CysC w surowicy wykonano w Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Badania dodatkowe tj. pomiary stężeń uromoduliny w surowicy i w moczu, NGAL w surowicy oraz KIM-1 w moczu przeprowadzono w Zakładzie Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej UJ CM w Krakowie.

#### *Analiza statystyczna*

Wstępne postępowanie stanowiła analiza normalności rozkładów badanych parametrów przy pomocy testu Kormogołowa-Smirnowa. Normalność rozkładów została oceniona za pomocą testu Shapiro-Wilka. Dane przedstawiono jako liczbę chorych dla zmiennych nominalnych oraz medianę (dolny-górny kwartyl) lub średnią  $\pm$  odchylenie standardowe dla zmiennych ciągłych. Różnice między podgrupami grupy badanej oceniano testem t-Studenta lub testem Manna-Whitney'a. Analizując korelacje wykorzystano współczynnik Persona lub R Spermana. Celem oszacowania wartości diagnostycznych testów badanych parametrów przeprowadzono analizy krzywych ROC (receiver operating characteristic) z wyznaczeniem punktów odcięcia. Za znamienne statystycznie określano wyniki przy  $p<0,05$ . Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

## **Charakterystyka prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**

### *Artykuł numer 1*

*Żylka A., Gala-Błędzińska A., Rybak K., Dumnicka P., Drożdż R., Kuśnierz-Cabala B.: Role of new biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. Folia Med Cracov. 2015; 55: 21-33.*

Będący wstępem do rozprawy doktorskiej artykuł stanowi przegląd aktualnej wiedzy na temat nowych biomarkerów DKD z uwzględnieniem umiejscowienia procesu patofizjologicznego uszkodzenia nerek w przebiegu DMt2. W artykule przedstawiono aktualne informacje na temat wybranych wskaźników DKD uwzględniając biomarkery uszkodzenia cewek nerkowych tj: uNGAL, KIM-1, uromodulinę, NAG, L-FABP oraz markery uszkodzenia kłębuszka nerkowego: CysC oraz interleukinę 18. W pracy przedstawiono również nowe kierunki w diagnostyce DKD wskazując na znaczenie markerów stresu oksydacyjnego, jako predyktorów zmian patofizjologicznych zachodzących w strukturach nefronu oraz kluczową rolę oksydazy NADPH oraz jej izoform, w tym NOX-4 prowadzących do powstawania reaktywnych form tlenu (*ROS - reactive oxygen species*), uszkadzających czynność zarówno śród błonka, jak i cewek nerkowych w DMt2.

Autorzy pracy podkreślili również możliwość wykorzystania nowych biomarkerów DKD związanych z dysfunkcją podocytów obserwowaną we wczesnych stadiach uszkodzenia nerek w środowisku cukrzycowym. Ponadto, zaznaczono rolę oznaczeń mikroRNAs (*mRNAs*) między innymi, jako markerów włóknienia nerek w przebiegu DKD oraz opisano możliwość wykorzystania proteomiki w prognozowaniu wystąpienia wczesnych etapów rozwoju choroby.

## *Artykuł numer 2*

*Gala-Błędzińska A., Żyłka A., Rybak K., Dumnicka P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.:*

*Usefulness of measuring urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and calculating NGAL to creatinine ratio as early predictors of kidney dysfunction in patients with type 2 diabetes. Diagn Lab. 2015; 51: 97-104.*

Celem badania była ocena użyteczności pomiarów stężenia NGAL w pierwszej porannej porcji moczu oraz wyliczenie wskaźnika uNCR u chorych z wczesną postacią uszkodzenia nerek rozwijającą się w przebiegu DMt2. Badaniem objęto 55 chorych z DKD pozostających pod opieką Poradni Nefrologicznej oraz 22 osoby w grupie kontrolnej bez DMt2. Do badania zakwalifikowani zostali chorzy bez cech jawnego białkomoczu, z wartością eGFR  $>60\text{ml/min}/1,73\text{m}^2$ . Wykazano wyższe stężenia uNGAL w moczu u chorych z DKD, jednak istotną statystycznie różnicę zaobserwowano tylko dla wartości uNCR. Wykazano, że wartości uNCR  $>21,3 \mu\text{g/g}$  mogą być pomocne we wczesnym przewidywaniu uszkodzenia cewek nerkowych w przebiegu DKD. W badaniu zaobserwowano istotnie statystycznie wyższe stężenia uNCR u kobiet, nie wykazując znamiennych różnic związanych z płcią dotyczących nieskorygowanych oznaczeń uNGAL. W artykule przedstawiono ponadto dodatnią korelację pomiędzy zmianą stężenia uNGAL i uNCR oraz stężeniem albuminy w moczu i wskaźnikiem uACR, obserwując tym samym ich wysoką specyficzność dla wczesnego uszkodzenia nefronu w DMt2, jednocześnie w grupie kontrolnej istotna statystycznie była jedynie korelacja uNGAL z albuminurią. W obu grupach nie zaobserwowano charakteryzujących się istotnością statystyczną korelacji uNGAL i uNCR z eGFR. Potwierdzeniem negatywnego wpływu aterogennego lipidogramu na progresję DKD stanowi przedstawienie dodatniej korelacji uNGAL z frakcją LDL-cholesterolu oraz triglicerydów z uNCR, a także zależność obu wskaźników z wartością uACR.

### *Artykuł nr 3*

*Żylka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. Dis Markers. 2016; doi.org/10.1155/2016/8489543.*

Niniejsza praca oryginalna przedstawia możliwość zastosowania nowych biowskaźników w diagnostyce DKD oraz ocenie ryzyka CVD na podstawie rocznej obserwacji chorych z DMt2 z uwzględnieniem zmian stężenia uNGAL w czasie oraz wielkości wskaźnika uNCR wynikających z podjętego leczenia nefroprotekcyjnego. Przedstawiona praca ma charakter prospektywnego badania obserwacyjnego. Do badania pierwotnie zakwalifikowano 55 chorych z DKD pozostających pod opieką Poradni Nefrologicznej. Po upływie roku obserwacji objęto 30 chorych z DMt2 w wieku  $64 \pm 13$  lat ze zwiększym ryzykiem rozwoju DKD bez jawnego białkomoczu oraz eGFR  $\geq 60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Chorych leczono zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [9]. Zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie stężenia uNGAL oraz uNCR u pacjentów po rocznej obserwacji, wskazując na pozytywny wpływ wielokierunkowego leczenia w hamowaniu progresji uszkodzenia cewek nerkowych w DKD.

W pracy zwrócono uwagę na obniżenie wartości albuminurii oraz wskaźnika uACR po rocznej obserwacji w grupie badanej, nie uzyskując jednak istotności statystycznej otrzymanych wyników.

U większości badanych osiągnięto poprawę w zakresie wyrównania cukrzycy, obserwując istotne statystycznie zmniejszenie wartości HbA<sub>1c</sub>, któremu towarzyszyło obniżenie wartości białkomoczu cewkowego definiowanego stężeniem uNCR.

W pracy wykazano, że wzrost uNCR powyżej 21,3 µg/g związany jest z większą częstością występowania CVD niezależnie od płci, wieku, czasu trwania cukrzycy, BMI (*Body Mass Index*) oraz hiperlipidemii, co stanowi potwierdzenie użyteczności klinicznej oceny wydalania NGAL z moczem w ocenie predykcji CVD niezależnie od oceny albuminurii i eGFR.

#### *Artykuł nr 4*

*Żylka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. Mediat Inflamm. 2018; doi.org/10.1155/2018/7659243.*

Celem niniejszej pracy była ocena możliwości wykorzystania w rutynowej diagnostyce DKD markerów uszkodzenia zarówno kłębuszków, jak i cewek nerkowych u pacjentów z DMt2 we wczesnym stadium CKD (G1/G2 A1/A2 wg KDIGO 2012) oraz ocena możliwości wykorzystania ich oznaczeń w prognozowaniu pogorszenia funkcji nerek u chorych z DMt2 po rocznej obserwacji. Wśród markerów uszkodzenia kłębuszków nerkowych oceniano w szczególności przydatność oznaczeń albuminy, transferyny, IgG w moczu oraz CysC w surowicy. Stopień uszkodzenia cewek nerkowych badano oznaczając stężenia NGAL w moczu, KIM-1 w moczu oraz uromoduliny w surowicy i w moczu. Do badania zakwalifikowano łącznie 80 pacjentów z DKD. U większości badanych (N=61; 77%) wartości uACR mieściły się <30mg/g, u pozostałych pacjentów stężenia uACR utrzymywały się pomiędzy 30 a 300 mg/g, natomiast u 10 chorych spośród 29 pacjentów (36% grupy badanej) po rocznej obserwacji stwierdzono podwyższenie stężenia uACR

pomimo stosowania leczenia nefroprotekcyjnego. Wykazano znaczącą zależność wyższych wartości uNGAL oraz sNGAL z pogorszeniem funkcji nerek wyrażoną spadkiem eGFR oraz istotną statystycznie korelację pomiędzy wzrostem uNGAL, uNCR, uKIM-1/kreatynina oraz IgG w moczu z podwyższeniem wartości uACR. W przedstawionej pracy stwierdzono znaczaco wyższe stężenia sCysC, sNGAL w surowicy, uNGAL, uNCR, uKIM-1, uKIM-1/kreatynina w moczu, transferyny i IgG w moczu oraz istotnie statystycznie niższe stężenie uromoduliny w surowicy u pacjentów z umiarkowaniem podwyższoną albuminurią, prezentując ich rolę jako potencjalnych czynników wskazujących na CKD w stadium G1/G2 A2. Jednocześnie podkreślono obiecującą rolę oznaczeń IgG oraz uKIM-1/kreatynina w moczu, jako najbardziej swoistych czynników predykcyjnych DKD u pacjentów z uACR  $\geq 30$  mg/g. W badaniu zaobserwowano możliwość wykorzystania we wczesnej diagnostyce DKD oznaczeń eGFR z wykorzystaniem wzoru opartego na sCysC (eGFR<sub>cys</sub>), wykazując znaczącą różnicę ich wartości w grupie pacjentów z CKD w stadium A1 oraz A2. Odnotowano jednocześnie brak powyższej korelacji w odniesieniu do eGFR wyliczonego na podstawie wzoru z zastosowaniem stężenia kreatyniny wyliczonego wg wzoru CKD-EPI (eGFR CKD-EPI). Podkreślono użyteczność diagnostyczną oznaczeń wskaźników uNGAL oraz uKIM-1 skorygowanych ze stężeniem kreatyniny w moczu (uNCR oraz uKIM-1/kreatynina w moczu) wykazując większą ich specyficzność w diagnostyce DKD.

Niniejsza praca jest pierwszym polskim doniesieniem dotyczącym oznaczeń stężenia uromoduliny w moczu oraz surowicy u pacjentów z wczesnym uszkodzeniem nerek w przebiegu DMt2. Przedstawiono odmiennosć patofizjologiczną uromoduliny w porównaniu z pozostałymi biowskaźnikami, związaną ze spadkiem jej stężenia w surowicy oraz w moczu u pacjentów zagrożonych rozwojem wczesnego uszkodzenia nerek. W pracy podkreślono brak istotnej korelacji stężenia uromoduliny zarówno w moczu, jak i w surowicy z wartością albuminurii oraz eGFR. Dodatkowo, wykazano ujemną korelację stężenia uromoduliny

w moczu z wartością HbA<sub>1c</sub>, mogącą wskazywać na większą podatność uszkodzenia cewek nerkowych u pacjentów z niedostatecznym stopniem wyrównania glikemii. Ponadto, w niniejszym artykule wykazano istotnie statystyczną korelację uACR, uNGAL, uNCR, transferyny, IgG, uromoduliny w moczu oraz wskaźnika uromodulina/kreatynina w moczu z poziomem HbA<sub>1c</sub> oraz albuminy w moczu, uACR , uNCR i IgG z długością trwania DMt2.

## **Wnioski i implikacje praktyczne przeprowadzonego badania**

### **Wnioski**

1. Wyniki przeprowadzonego badania potwierdzają użyteczność zastosowania oznaczeń stężenia uNGAL oraz wyliczanego wskaźnika uNCR w diagnostyce wczesnych stadiów DKD. Potwierdzeniem wysokiej specyficzności tych biowskaźników dla przewidywania wczesnego uszkodzenia nerek w DMt2 stanowi wykazanie dodatniej korelacji uNGAL i uNCR z albuminurią oraz uACR. Ustalenie punktu odcięcia dla wskaźnika uNCR=21,3 µg/g umożliwia wyodrębnienie grupy chorych zagrożonych uszkodzeniem cewek nerkowych w przedklinicznym stadium choroby.
2. U pacjentów z DKD będących w rocznej obserwacji, wykazano istotne statystycznie obniżenie stężenia uNGAL oraz uNCR w grupie badanej, poddanej wielokierunkowemu leczeniu nefroprotekcyjnemu oraz znamienne obniżenie wartości HbA<sub>1c</sub>. Wykazano, że lepsza kontrola glikemii ma związek z poprawą czynności kanalików nerkowych, zmniejszając białkomocz cewkowy. W badaniu wykazano ponadto użyteczność diagnostyczną uNCR w szacowaniu zwiększonego ryzyka występowania CVD.
3. Potwierdzono użyteczność diagnostyczną podwyższonych stężeń sCysC, sNGAL w surowicy, uNGAL, uNCR, uKIM-1, uKIM-1/kreatynina w moczu, transferyny i IgG w moczu oraz spadku stężenia uromoduliny w surowicy w grupie badanej z DMt2 w predykcji CKD w stadium G1/G2 A2. Największą wartość pola powierzchni pod krzywą ROC wykazano dla oznaczeń IgG oraz wskaźnika uKIM-1/kreatynina w moczu. Wykazano, iż większość badanych biowskaźników dodatnio koreluje ze stopniem wyrównania cukrzycy wyrażoną wartością HbA<sub>1c</sub>, co potwierdza użyteczność ich zastosowania w praktyce klinicznej celem monitorowania skuteczności leczenia pacjentów z DMt2.

4. Przedstawiona istotnie statystycznie znamienna zależność pomiędzy wyższymi stężeniami uNGAL oraz sNGAL oraz obniżaniem się wartości eGFR oraz podwyższonymi stężeniami uNGAL, uNCR, uKIM-1/kreatynina oraz IgG w moczu ze wzrostem uACR po rocznej obserwacji pacjentów z DMt2, wskazuje na możliwość zastosowania powyższych markerów w prognozowaniu postępującego uszkodzenia nerek.
5. Autorzy badania potwierdzili użyteczność diagnostyczną oznaczeń eGFR z wykorzystaniem wzoru z zastosowaniem sCysC (eGFR<sub>cys</sub>), w celu wyodrębniania grup pacjentów zagrożonych wcześnieym rozwojem uszkodzenia nerek w DMt2.

#### *Implikacje praktyczne i ograniczenia przeprowadzonego badania*

Prowadzona rutynowo diagnostyka uszkodzenia nerek w przebiegu DMt2 z wykorzystaniem oceny stężenia kreatyniny w surowicy oraz albuminurii, pozostaje niewystarczająca do precyzyjnej oceny nefropatii. Pojawienie się albuminy w moczu nie jest specyficzne dla DKD, wskazuje natomiast na uszkodzenie bariery filtracyjnej niezależnie od zmian zachodzących w cewkach nerkowych i śródmiąższu nerki. Wobec powyższych, zmianie powinien ulec również u chorych z DMt2 plan diagnostyczny wprowadzający w ramach rutynowych kontroli nefrologicznych oznaczenie nowych biomarkerów DKD, informujących o uszkodzeniu również pozaklębuszkowych struktur nefronu w przedklinicznej fazie choroby. W przedstawionej pracy doktorskiej dokonano oceny użyteczności diagnostycznej szeregu wskaźników, jednak w celu wdrożenia ich oznaczeń do codziennej praktyki, konieczne jest potwierdzenie uzyskanych wyników w badaniach z udziałem większej grupy pacjentów. Kluczowe wydaje się również ustalenie wartości granicznych dla badanych biomarkerów w diagnostyce DKD.

Wyniki uzyskane podczas badań przedstawionych w pracy doktorskiej wskazują również na potrzebę prowadzenia kolejnych badań mających na celu obniżenie wartości referencyjnych dla rozpoznania podwyższonej albuminurii.

### **3. Artykuł nr 1**

*Żylka A., Gala-Błędzińska A., Rybak K., Dumnicka P., Dróżdż R., Kuśnierz-Cabala B.: Role of new biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. Folia Med Cracov.* 2015; 55: 21-33.

## Role of new biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2

AGNIESZKA ŹYŁKA<sup>1</sup>, AGNIESZKA GALA-BŁĄDZIŃSKA<sup>1</sup>, KATARZYNA RYBAK<sup>1</sup>,  
PAULINA DUMNICKA<sup>2</sup>, RYSZARD DROŻDŹ<sup>2</sup>, BEATA KUŚNIERZ-CABALA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> St' Queen Jadwiga Clinical District Hospital No2 in Rzeszów, Poland

<sup>2</sup> Department of Medical Diagnostics, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

<sup>3</sup> Department of Diagnostics, Chair of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

**Corresponding author:** Beata Kuśnierz-Cabala, PhD, DSC; Department of Diagnostics,  
Chair of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College

ul. Kopernika 15A, 31-501 Kraków, Poland; Phone/Fax: +48 12 424 83 65; E-mail: mailto:mbkusnie@cyf-kr.edu.pl

**Abstract:** In twenty first century, the incidence of type 2 diabetes mellitus (DMt2) dramatically increases, followed by the number of patients suffering from its complications. Currently, diabetic kidney disease (DKD) is the leading cause of renal replacement therapy. Often, DMt2 is diagnosed after several years of duration, and irreversible organ damage can develop during that period. On the other hand, the early diagnosis of DKD in the preclinical phase, when glomerular filtration rate (GFR) is still maintained and there are no evident changes in urinalysis, gives the possibility of implementing the nephroprotective treatment that can significantly delay the progression of the disease. However, the diagnostic tests available in clinical practice, i.e. serum creatinine, estimated glomerular filtration rate (eGFR) and albuminuria have important limitations. There is a need for new, early and non-invasive biomarkers specific for kidney injury, allowing for differentiation between glomerular and tubular injury, and changing dynamically in response to the degree of kidney damage. Hereby, we review the current knowledge about the novel and emerging biomarkers of kidney injury and their used for the diagnosis of DKD.

**Key words:** diabetic kidney disease, biomarkers, diabetes mellitus type 2.

### Introduction

It is estimated that nearly 387 mln people in the world suffer from diabetes. Its prevalence exceeds 8,3% and gradually increases [1]. Diabetic kidney disease (DKD) has been regarded as one of the chronic complications of diabetes resulting from microangiopathy.

DKD is the most common cause of chronic kidney disease (CKD), leading over time to the necessity for renal replacement therapy [2]. Among patients with type 2 diabetes mellitus (DMt2), CKD is one of the most common causes of hospitalisation, associated with cardiovascular events, cardiovascular mortality, and also total mortality [3]. It is also the only complication which incidence has not decreased despite the improvement in the methods of diabetes control during the last 20 years [4]. Thus, the strategy aiming at the decrease of CKD incidence and progression in DMt2 needs to be improved.

### Current criteria of DKD diagnosis

In nearly 70% of DMt2 patients, the coexisting insulin resistance and the diabetic environment, exert different effects on kidneys in comparison with the changes observed in type 1 diabetes [5]. The long term hyperglycemia in poorly controlled diabetes, together with the coexisting hypertension and hyperlipidemia are considered the main causes of DKD progression in patients with DMt2 [5]. The recommendations published by the Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) working group in 2002 [6] introduced the term DKD as one of the CKD forms, and the albumin concentration measured in 24-hour urine sample has been considered a standard for the assessment of kidney disease in the course of diabetes. However, urine albumin to creatinine ratio (UACR) measured in a spot urine sample may be used in routine care in order to estimate urine albumin excretion. Since 2007, KDOQI has recommended that increased UACR (formerly termed “micro-” or “macroalbuminuria”) should be confirmed by at least 2 further measurements performed in first morning urine samples [7].

Albuminuria is not specific for kidney injury in the course of DMt2. Increased urine albumin excretion is observed in glomerulopathies irrespective of the cause, as well as in medical conditions associated with increased vascular permeability, i.e. severe infections or heart failure [8]. Moreover, increased albuminuria does not have to be caused by kidney injury, but may be associated with hyperfiltration as observed in febrile patients, in those with urinary tract infections, or in healthy people following significant physical activity.

At present, the terms “microalbuminuria” and “macroalbuminuria” are not further recommended. The loss of albumin in urine in quantities of 30–300 mg/day should be considered a moderately increased albuminuria. Higher albumin loss in urine is consequently called severely increased albuminuria. The former term “microalbuminuria” has incorrectly suggested the presence of “microalbumine” in urine, or could have been interpreted as the finding of minimal clinical importance, therefore it has been abandoned. According to the recommendations of Polish Diabetological Association published in 2015 [8], the laboratory tests that should be performed for the diagnosis and assessment of DKD include urine albumin excretion and serum creatinine mea-

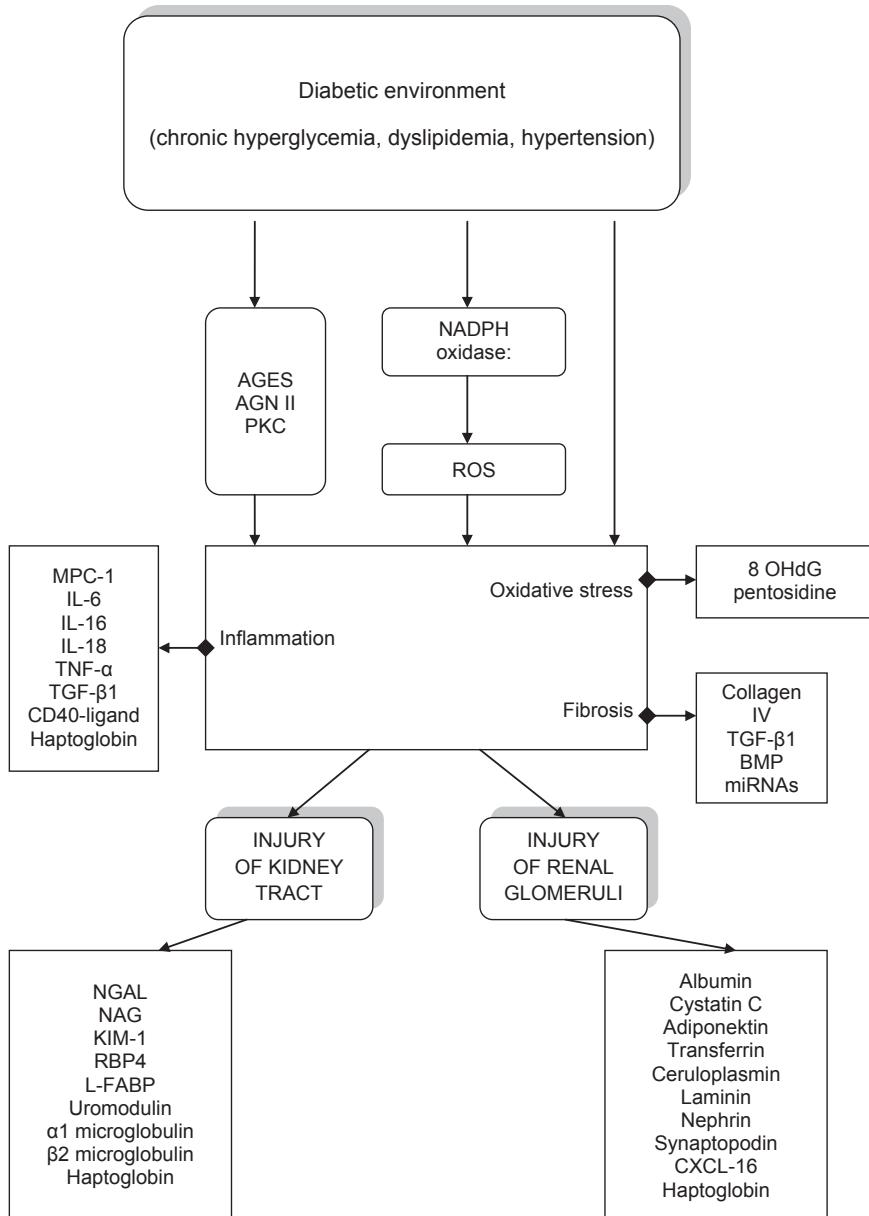
surements followed by the estimation of glomerular filtration rate (GFR) according to Modification of Diet in Renal Diseases (MDRD) or Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equations. Screening towards increased albuminuria should be done in each patient with DMt2 at least once a year starting from the diagnosis of diabetes [8].

## Pathophysiology of kidney damage in DMt2

The morphological changes in the course of DKD involve the structures of glomeruli, including endothelial cells, basement membrane, podocytes and slit membrane. The mesangial expansion, increased numbers of interstitial cells and tubular lesions have also been observed [5]. However, there is only a weak association between the severity of morphological changes in kidneys and the routinely used laboratory and clinical markers of kidney injury (i.e. increased urine albumin and total protein, increased serum creatinine and decreased eGFR, high blood pressure) [5]. Moderately increased albuminuria (30–300 mg/g creatinine) is a first sign of DKD only in a part of patients. In about 30% of DMt2 patients, the decrease in GFR occurs without increased albuminuria [9]. Moreover, it must be remembered that DKD is not the only cause of CKD among patients with diabetes. For a proper diagnosis, imaging tests, and in selected cases, histological examination of kidney biopsy may be indicated apart from albuminuria and serum creatinine. Unfortunately, in routine clinical practice such tests may be difficult to perform. According to the data from the Polish registry of nephropathies diagnosed based on kidney biopsy (2009–2012) concerning DMt2 patients, DKD has been diagnosed in about 2% of biopsies, whereas 60% of biopsies resulted in the diagnosis of other nephropathies [10] (it must be remembered, however, that kidney biopsy as an invasive procedure is not indicated in typical course of DKD). It should also be noted that obesity (often preceding DMt2) causes focal segmental glomerulosclerosis [11]. Thus, it would be interesting to investigate the existing and emerging biomarkers of kidney injury in the association to the specific lesions described following kidney biopsy and histological examination. On account of composite pathomechanism of kidney injury in DMt2 and in order to systematise knowledge about these processes, markers of DKD are divided into bioindicators of injury of kidney tract, injury of renal glomeruli, oxidative stress and inflammation. Figure 1 presents the role of particular biomarkers for the pathogenesis of DKD in DMt2.

## The ideal biomarker of kidney injury in DMt2

The diagnostic procedures used in kidney diseases, based on serum creatinine, urinalysis, and imaging tests may sometimes be inaccurate. Kidney biopsy, in turn, is associated with significant invasiveness. Serum creatinine concentrations depend not only on GFR, but



**Fig. 1.** Role of particular biomarkers for the pathogenesis of DKD in DMt2.

AGES — advanced glycation end-products; AGN II — angiotensin II; BMP — bone morphogenetic protein; CXCL-16 — chemokine (C-X-C motif) ligand 16; DKD — diabetes kidney disease; DMt2 — diabetes mellitus type 2; IL-6 — interleukin 6; IL-16 — interleukin 16; IL-18 — interleukin 18; KIM-1 — kidney injury molecule-1; L-FABP — liver type fatty acid binding protein; MPC-1 — monocyte chemoattractant protein-1; miRNAs — microRNAs; NAG — N-acetyl-beta-D-glucosaminidase; NGAL — neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NADPH — nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced); NOX 1-5 — NADPH oxidase 1-5; 8 OHdG pentosidine — 8-hydroxy-deoxy guanosine pentosidine; PKC — protein kinase C; RBP4 — retinol binding protein 4; ROS — reactive oxygen species; TGF- $\beta$ 1 — transforming growth factor beta 1; TNF- $\alpha$  — tumor necrosis factor  $\alpha$

also on many additional factors, such as muscle mass, sex, age, diet or pharmacological treatment [12]. Also, creatinine in urine comes not only from glomerular filtration, but it is also excreted by the proximal tubule, which leads to falsely increased estimates of GFR based on creatinine clearance [12]. The ideal marker of GFR should be freely filtered in glomerulus, and neither excreted, nor absorbed in kidney tubules. Its concentrations should be easy to determine. It should be specific for kidney damage, and dynamically respond to the changes in GFR, also to the improvement in kidney function following treatment. It is expected that such a marker will be able to predict cardiovascular changes. A good biomarker of decreased GFR, together with a proper marker of tubular injury, would allow for the diagnosis of DKD (or the risk for DKD) in DMt2 patients without increased albuminuria before the kidneys are irreversibly damaged.

### Albuminuria in the course of DMt2

In the course of DKD, a damage to the filtration barrier leads to increased leak of plasma proteins with a molecular mass below 40 kDa, including albumin and transferrin. Such proteins are also filtered by the healthy renal glomeruli, although in lower amounts, and are reabsorbed by a proximal tubule [13]. Thus, increased excretion of such proteins in urine may be due to increased filtration in the or due to diminished reabsorption in the initial part of the nephron [13].

Currently, albuminuria is the gold standard in the diagnosis of DKD and the evaluation of its advancement [8]. Albuminuria should be regarded as a marker of an ongoing kidney damage, not as a risk factor for DKD [13]. Albuminuria is the independent predictor of cardiovascular and renal risk in diabetic patients [8]. However, about 30% of DMt2 patients with renal failure do not have albuminuria [9]. Among DMt2 patients without albuminuria or proteinuria, advanced glomerulosclerosis has been observed in kidney biopsies [14]. Also, the cut-off value for increased albuminuria is a matter of debate. The cut-off value for UACR of 30 mg/g seems too high, and many researchers consider UACR above 15 mg/g as a sign of kidney pathology or kidney risk [15]. Most recommendations for early nephroprotection in DMt2 are aimed at controlling albuminuria. Facing the increasing numbers of patients with DKD, there is a need for the early biomarkers of kidney injury, that may be used in patients without increased albuminuria, or that would precede the increase in albuminuria.

### New biomarkers of DKD

The promising biomarkers in the field include urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1), serum cystatin C (CysC), uromodulin (UMOD), urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), liver type fatty acids binding protein (L-FABP) and serum interleukin 18 (IL-18).

## Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NGAL, also known as lipocalin 2, is a 25 kDa secretory protein belonging to the lipocalin family, detected in neutrophils' granules [16]. In response to renal ischemia or toxic injury, NGAL expression significantly increases in the ascending limb of the loop of Henle. Urine NGAL concentrations are also correlated with its serum concentrations [17]. NGAL has been studied mainly as a biomarker of acute kidney injury (AKI). In AKI, increased urinary NGAL (uNGAL) concentrations have been observed already after 4–6 hours from injury, thus NGAL has been regarded a “renal troponin” [18–20]. In CKD, including DKD, NGAL is considered as a diagnostics and prognostic marker. Bolignano *et al.* [21] observed that uNGAL increased and correlated with the advancement of kidney disease in patients with DKD both with and without albuminuria. In the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study [22], in patients with CKD stage G2-G4, increased uNGAL reflected the risk of cardiovascular complications. However, Helmresson *et al.* [23] observed high biological variation of uNGAL among patients with CKD due to tubular disorders, therefore they recommend both the assessment of uNGAL concentration and the calculation of uNGAL to urine creatinine ratio (uNGAL/uCr). In pathophysiology of DKD, NGAL may play an important role in adaptation of tubular cells to the damaging influence of diabetic environment. Summarizing, uNGAL can become a useful and non-invasive tool for the evaluation of kidney function, overtaking the classic markers, i.e. albuminuria or eGFR [21, 24]. It seems that a useful strategy in an evaluation of kidney disease in DMt2 patients would include the determination of an initial uNGAL concentration and uNGAL/uCr value and then the monitoring of their changes [24].

## Kidney injury molecule-1

KIM-1 seems to be another promising biomarker of tubular injury. It is a type 1 transmembrane glycoprotein containing in its extracellular part the immunoglobulin and the mucous domains [25]. It is expressed in proximal renal tubule in response to hypoxia or injury, and is not detected in healthy people [26, 27]. Urinary KIM-1 is increased in AKI from the first day after toxic or ischemic injury [28]. However, KIM-1 expression in renal tubules has been also observed in the course of the focal glomerulosclerosis, IgA nephropathy, or membranoproliferative glomerulonephritis [29, 30]. On the basis of these observations it has been suggested that KIM-1 can serve as a biomarker of chronic tubular injury [29, 30]. Currently, studies are ongoing on KIM-1 usefulness as a diagnostic marker in CKD. Following 3.5-year observation of patients with DKD, it has been shown that the increase of urinary KIM-1 correlates positively with albuminuria and negatively with GFR changes, however, it does not correlate with HbA<sub>1c</sub> [31]. In turn, Fu *et al.* [32] reported higher urinary KIM-1 in 101 patients with DMt2 observed

for 5 years as compared with the control group, however, they did not confirm the correlations with UACR or eGFR. The available data are insufficient for the assessment of KIM-1 usefulness as a diagnostic tool in DKD, in particular among patients without albuminuria. Further studies are necessary, especially in the Caucasian population.

### Cystatin C

CysC is a single chain 120 amino acid polypeptide, belonging to the cysteine proteinases inhibitors. It is freely filtered by glomeruli, then reabsorbed and metabolised in proximal tubules [33]. Its concentrations in serum, unlike creatinine, do not depend on the muscle mass neither the diet [33]. The determination of serum CysC is useful for early detection of the decrease in glomerular filtration rate. A formula utilizing both serum creatinine and serum CysC allows for a precise estimation of GFR [34]. According to the 2012 KDIGO guidelines, serum CysC should be determined in adults with eGFR between 45 and 59 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> and without other signs of renal disease, in order to confirm CKD [35]. In patients with DKD, Woo *et al.* [36] reported higher usefulness of GFR estimation with the use of serum CysC than serum creatinine. Moreover, in Chinese patients with DMt2 [37] and in the study of Triki *et al.* [38] serum CysC predicted cardiovascular complications. The promising report of Garg *et al.* [39] has shown increased CysC concentrations in patients with glucose intolerance and without albuminuria. According to current knowledge, serum CysC should be used for early detection of kidney disease as well as for verification of GFR estimates based on serum creatinine [8].

### Uromodulin

UMOD, also known as Tamm-Horsfall's protein, is a glycoprotein synthesized exclusively in kidneys, where it is expressed in a thick ascending limb of the loop of Henle and in the initial segment of the distal tubule. Following its proteolysis, it is released to urine under physiological conditions and is a most abundant urinary protein in healthy people, however, it is also detectable in serum [40]. Urinary UMOD has been reported to prevent urinary tract infections and crystallization of salts [40]. In 1978, pathological localization of UMOD in kidneys has been detected in tubulointerstitial diseases, including medullary cystic disease, chronic pyelonephritis and hydronephrosis [41]. More recently, interesting observations have been provided by the human genome-wide association studies, which identified the associations between UMOD gene mutations and the increased risk of hypertension, kidney stones and CKD [42]. Prajczer *et al.* [43] has shown negative correlations between urinary UMOD concentrations and serum creatinine and positive correlation with eGFR. Also, Zhou *et al.* [44] reported that low urinary UMOD in the initial stages of CKD predicted fast GFR decrease among patients with IgA nephropathy. In the last

study, urinary UMOD correlated with the advancement of tubular atrophy and interstitial tissue fibrosis [44]. The last report is promising, however, more evidence is necessary in order to assess the usefulness of urinary or serum UMOD as the early markers of CKD.

### **N-acetyl-beta-D-glucosaminidase**

NAG is the enzyme that is not filtered in renal glomeruli, and its increased activity in urine appears following toxic injury of renal tubules [45]. In diabetic patients, positive correlations have been observed between increased NAG activity in urine and albuminuria, diabetes duration, poor diabetes control, serum CysC and urine NGAL [46]. In the study of Sheira *et al.* [47] conducted in a group of 50 DMt2 patients, urine NAG positively correlated with UACR, serum creatinine, and HbA<sub>1c</sub>. Moreover, urine NAG activity was associated with the advancement of kidney disease in DMt2. NAG seems to be the promising DKD marker, increased already in a preclinical DKD, before significant increase in albuminuria. However, there is a need for further research on this marker in Caucasian population.

### **Liver type fatty acid binding protein**

L-FABP is a protein expressed in hepatocytes as well as in the cells of the nephron proximal tubules [48], which appears in urine following tubular injury. Fergusson *et al.* [49] reported the role of L-FABP as a biomarker of AKI. Higher urine concentrations of L-FABP have been observed in DMt2 patients as compared with healthy individuals; moreover, it correlated with increasing albuminuria and decreasing GFR [50, 21]. In the study of Nauta *et al.* [51], among the measured markers of tubular injury, L-FABP was the most strongly correlated with eGFR. L-FABP seems the promising marker of DKD, that may be helpful in detecting the preclinical stages of the disease.

### **Interleukin 18**

IL-18 is a cytokine produced mainly by macrophages. The first known function of IL-18 was a strong stimulation of T lymphocytes and NK cells to the production of interferon γ [52]. The cytokine is also involved in the polarisation of immune response [52]. Apart from the physiological role, IL-18 has been associated with severe inflammatory reactions. Also, its pathophysiological role in DMt2 has been suggested [53]. In a group of 151 patients with DMt2, Moriwaki *et al.* [54] observed significantly increased serum IL-18 concentrations in comparison with the control group. Currently, the research are ongoing aimed at the evaluation of IL-18 as the early marker of DKD. Interesting observations were made by Szeto *et al.* [55] among 220 patients with DMt2: increased IL-18 correlated with the cardiovascular mortality.

## New trends in diagnosing DKD

### Oxidative stress and novel therapeutic targets in DKD

There are several mechanisms in which hyperglycemia acts in a damaging way on both the endothelial cells and the epithelial cells of renal tubules, including increased polyol pathway flux, increased advanced glycation end-product formation, activation of protein kinase C, and increased hexosamine pathway flux. The common element linking these mechanisms is an increased production of superoxide by the mitochondrial electron-transport chain [56]. The overproduction of reactive oxygen species (ROS) results in the oxidative stress leading among others to renal tubular injury and the interstitial tissue fibrosis in DMt2 [56]. NADPH oxidase plays a key role in the oxidative stress. The enzyme has several isoforms, of which the NOX-4 seems the most important in the mechanism of ROS generation [57]. The animal studies by Thallas-Bonke *et al.* [58], revealed the advantageous effect of NOX-4 gene deletion on the progression of DKD. Further studies are needed to evaluate the associations between NOX isoforms and the DKD progression.

### Dysfunction of podocytes in DKD pathogenesis

In the search for early DKD markers, it has been observed that podocyturia as well as urine excretion of proteins associated with podocytes can be a source of early DKD biomarkers. Wang *et al.* [59] has shown the presence of nephrin and synaptopodin in urine of patients with DMt2 with proteinuria and reduced GFR. The results of Zhao *et al.* [60] are also promising. The study suggested a role of the CXCL-16 ligand for C-X-X chemokines, taking part in the LDL metabolism within the podocytes, as the early biomarker of renal injury in DMt2.

### MicroRNAs

The microRNAs (miRNAs) seem to be promising as the markers of renal fibrosis in the course of DKD. Xu *et al.* [61] has reported the role of miRNAs: miR-216A, miR-217, miR-192, miR-377, miR-21, miR-29c in DKD prognosis. The increased concentration of miR-21 has been shown in kidney biopsies from patients with DKD [62].

### Proteomics as the promising DKD diagnostic and prognostic method

The proteomic methods utilizing mass spectrometry seems to have a great potential in providing data on protein profiles constituting the “finger print” of the diseases [11, 63]. The methods allowed for introducing several biomarkers of AKI and CKD, present in urine, blood or tissues. The proteomics has been termed a „liquid kidney biopsy”, as

a non-invasive tool that could potentially be used in a preclinical phase of kidney diseases [63]. Rossing *et al.* [64] have identified the peptide profiles in urine in the group of patients with DMt1 and DMt2, which seem to have been better predictors of DKD progression than albuminuria. Also, the method identified 12 metabolites of glucose metabolism in the glycolytic pathway, which possess the prognostic value for DKD in DMt2. The proteomics in nephrology has the multidirectional character and constitute the promising method of searching for DKD biomarkers. However, in order to define the diagnostic sensitivity and specificity of the markers, further studies are needed, verifying the results on the larger groups of patients.

## Conclusions

Due to the significant diversity of histopathological changes observed in kidneys in the course of DMt2 and the accompanying diverse clinical picture of DKD, additional diagnostic tools are necessary, except for eGFR and albuminuria. The kidney injury in DMt2 is often irreversible, especially in patients with decreased GFR and increasing albuminuria. Early diagnosis and multidirectional treatment constitute the only effective way of stopping the progression of kidney disease and improving prognosis. In clinical practice, the intensive treatment undertaken in the advanced disease may only slow down its progression. Due to the insufficient diagnostic sensitivity of clinically used markers, the research are ongoing to identify the new markers allowing for early diagnosis of the disease and introducing the proper treatment in the preclinical phase of diabetic kidney injury. However, further research is needed before implementing the novel markers in wide clinical practice.

## Conflict of interest

None declared.

## References

1. Aguirre F, Brown A., Cho N.H., *et al.*: 6th edition of the IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. 2013; 1–155.
2. Collins A.J., Foley R.N., Chavers B., *et al.*: US Renal Data System 2013 Annual Data. Am J Kidney Dis. 2014; 63: A7. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.11.001.
3. Park C.W.: Diabetic kidney disease: from epidemiology to clinical perspectives. Diabetes Metab J. 2014; 38: 252–260. doi: 10.4093/dmj.2014.38.4.252.
4. Gregg E.W., Li Y., Wang J., *et al.*: Changes in Diabetes-Related Complications in the United States, 1990–2010. N Engl J Med. 2014; 370: 1514–1523. doi:10.1056/NEJMoa1310799.
5. Czekalski S.: Cukrzycowa choroba nerek (nefropatia cukrzycowa) i inne choroby nerek w cukrzycy. Wydawnictwo Termedia. 2007; 15–17.

6. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39: 1–266.
7. K/DOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendation for diabetes and chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2007; 49: 12–154.
8. Czech A., Cypryk K., Czupryniak L., et al.: Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę typu 2. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Clinical Diabetology.* 2015; 4: A3–A34.
9. Kim S.S., Song S.H., Kim I.J., et al.: Nonalbuminuric proteinuria as a biomarker for tubular damage in early development of nephropathy with type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014; 30: 736–741. doi: 10.1002/dmrr.2546.
10. Perkowska-Ptasińska A., Bartczak A., Wągrowska-Danilewicz M., et al.: Epidemiologia chorób nerek w Polsce. Przegląd wybranych danych Polskiego Rejestru Nefropatii rozpoznawanych na podstawie biopsji nerek. XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. Lublin 2014.
11. Kępka A., Waszkiewicz N., Chojnowska S., et al.: Utility of urinary biomarkers in kidney transplant function assessment. *Current Issues Future Direction Kidney Transplant.* 2013; 3: 61–77. doi: 10.5772/54746.
12. Hyla-Klekot L., Kokot F.: Biomarkery uszkodzenia nerek. *Postępy Nauk Med.* 2009; 1: 28–33.
13. de Jong P.E., Gansevoort R.T.: Albuminuria in non-primary renal disease: risk marker rather than risk factor. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25: 656–658. doi: 10.1093/ndt/gfp691.
14. Budhiraja P., Thajudeen B., Popovtzer M.: Absence of albuminuria in type 2 diabetics with classical diabetic nephropathy: Clinical pathological study. *JBiSE.* 2013; 6: 20–25. doi: 10.4236/jbise.2013.65A005.
15. Verhave J.C., Gansevoort R.T., Hillege H.L., et al.: An elevated urinary albumin excretion predicts de novo development of renal function impairment in the general population. *Kidney Int Suppl.* 2004; 92: 18–21. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.09205.x.
16. Marchewka Z.: Low Molecular Weight Biomarkers in the Nephrotoxicity. *Adv Clin Exp Med.* 2006; 15: 1129–1138.
17. Liu K.D., Yang W., Anderson A., et al.: Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels do not improve risk prediction of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013; 83: 909–914. doi: 10.1038/ki.2012.458.
18. Bagshaw S.M., Bellomo R., Devarajan P., et al.: Acute kidney injury in critical illness. *Can J Anaesth.* 2010; 57: 985–998. doi: 10.1007/s12630-010-9375-4.
19. Devarajan P.: Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr.* 2011; 23: 194–200. doi: 10.1097/MOP.0b013e328343f4dd.
20. Małyszko J.: NGAL jako troponina w nefrologii. Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna 2009; 111–116.
21. Bolignano D., Lacquaniti A., Coppolino G., et al.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4: 337–344. doi: 10.2215/CJN.03530708.
22. Liu K.D., Yang W., Go A.S., et al.: Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin and risk of cardiovascular disease and death in CKD: Results from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. *Am J Kidney Dis.* 2015; 65: 267–274. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.07.025.
23. Helmersson-Karlqvist J., Arnlov J., Larsson A.: Day-to-day variation of urinary NGAL and rational for creatinine correction. *Clin Biochem.* 2013; 46: 70–72. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.09.022.
24. Gala-Błędzińska A., Żyłka A., Rybak K., et al.: Usufulness 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.
25. Fontanilla J., Han W.K.: Kidney injury molecule-1 as an early detection tool for acute kidney injury and other kidney diseases. *Expert Opin Med Diagn.* 2011; 5: 161–173. doi: 10.1517/17530059.2011.552496.
26. van Timmeren M.M., van den Heuvel M.C., Bailly V., Bakker S.J., van Goor H., Stegeman C.A.: Tubular kidney injury molecule-1(KIM-1) in human renal disease. *J Pathol.* 2007; 212: 209–217.

27. Han W.K., Bailly V., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre J.V.: Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002; 62: 237–244.
28. Liang X.L., Shi W.: Beyond early diagnosis: prognostic biomarkers for monitoring acute kidney injury. *Hong Kong J Nephrol.* 2010; 12: 45–49. doi: 10.1016/S1561-5413(10)60011-7.
29. Connick M., Ishani A.: Renal biomarkers of kidney injury in cardiorenal syndrome. *Curr Heart Fail Rep.* 2011; 8: 99–105.
30. Peters H.P., Waanders F., Meijer E., et al.: High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26: 3581–3588. doi: 10.1093/ndt/gfr135.
31. Nielsen S.E., Schijoedt K.J., Astrup A.S., et al.: 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: 1144–1150. doi: 10.1111/j.1464-5491.2010.03083.x.
32. Fu W.J., Xiong S.L., Fang Y.G., et al.: Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *Endocrine.* 2012; 41: 82–88. doi: 10.1007/s12020-011-9509-7.
33. Roos J.F., Doust J., Tett S.E., Kirkpatrick C.M.: Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children—metaanalysis. “Clinical biochemistry”. *Clin Biochem.* 2007; 40: 383–391.
34. Zahran A., El-Husseini A., Shoker A.: Can cystatin C replace creatinine to estimate glomerular filtration rate? A literature review. *Am J Nephrol.* 2007; 27: 197–205.
35. KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update. *Am J Kidney Dis.* 2012; 60: 850–886. doi:10.1053/j.ajkd.2012.07.005.
36. Woo K.S., Choi J.L., Kim B.R., Kim J.E., Han J.Y.: Clinical usefulness of serum cystatin C as a marker of renal function. *Diabetes Metab J.* 2014; 38: 278–284. doi: 10.4093/dmj.2014.38.4.278.
37. Ogawa Y., Goto T., Tamasawa N., et al.: Serum cystatin C in diabetic patients. Not only an indicator for renal dysfunction in patients with overt nephropathy but also a predictor for cardiovascular events in patients without nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 79: 357–361.
38. Triki S., Fekih O., Hellara I., et al.: Association between serum cystatin C levels and cardiovascular diseases in type 2 diabetic patients. *Ann Biol Clin (Paris).* 2013; 71: 438–442. doi: 10.1684/abc.2013.0857.
39. Garg V., Kumar M., Mahapatra H.S., Chitkara A., Gadpayle A.K., Sekhar V.: Novel urinary biomarkers in pre-diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2015; 19: 895–900. doi: 10.1007/s10157-015-1085-3.
40. Vyletal P., Bleyer A.J., Kmoch S.: Uromodulin biology and pathophysiology—an update. *Kidney Blood Press Res.* 2010; 33: 456–475. doi: 10.1159/000321013.
41. Zager R.A., Cotran R.S., Hoyer J.R.: Pathologic localization of Tamm-Horsfall protein in interstitial deposits in renal disease. *Lab Invest.* 1978; 38: 52–57.
42. Kottgen A., Pattaro C., Boger C.A., et al.: New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* 2010; 42: 376–384. doi: 10.1038/ng.568.
43. Prajcer S., Heidenreich U., Pfaller W., Kotanko P., Lhotta K., Jennings P.: Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25: 1896–1903. doi: 10.1093/ndt/gfp748.
44. Zhou J., Chen Y., Liu Y., et al.: Urinary uromodulin excretion predicts progression of chronic kidney disease resulting from IgA nephropathy. *PLoS One.* 2013; 8: e71023. doi: 10.1371/journal.pone.0071023.
45. Liangos O., Perianayagam M.C., Vaidya V.S., et al.: Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 904–912.
46. Basturk T., Altuntaş Y., Kurklu A., Aydin L., Eren N., Unsal A.: Urinary N-acetyl B glucosaminidase as an earlier marker of diabetic nephropathy and influence of low-dose perindopril/indapamide combination. *Renal Fail.* 2006; 28: 125–128.
47. Sheira G., Noreldin N., Tamer A., Saad M.: Urinary biomarker N-acetyl-β-D-glucosaminidase can predict severity of renal damage in diabetic nephropathy. *J Diabetes Metab Disord.* 2015; 14: 4. doi: 10.1186/s40200-015-0133-6.

48. Piarulli F., Sartore G., Ceriello A., et al.: Relationship between glyco-oxidation, antioxidant status and microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2009; 52: 1419–1425. doi: 10.1007/s00125-009-1367-y.
49. Ferguson M.A., Vaidya V.S., Waikar S.S., et al.: Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int.* 2010; 77: 708–714. doi: 10.1038/ki.2009.422.
50. Kamijo A., Sugaya T., Hikawa A., et al.: Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1243–1255.
51. Nauta F.L., Boertien W.E., Bakker S.J., et al.: Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34: 975–981. doi: 10.2337/dc10-1545.
52. Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H.: Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12: 53–72.
53. Boraschi B., Dinarello C.A.: IL-18 in autoimmunity: review. *Eur Cytokine Netw.* 2006; 17: 224–252.
54. Moriwaki Y., Yamamoto T., Shibutani Y., et al.: Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. *Metab Clin Exp.* 2003; 52: 605–608. doi: 10.1053/meta.2003.50096.
55. Szeto C.C., Chow K.M., Poon P.Y., Kwan B.C., Li P.K.: Association of interleukin-18 promoter polymorphism and atherosclerotic diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2009; 14: 606–612. doi:10.1111/j.14401797.2008.01075.x.
56. Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414: 813–820.
57. Gorin Y., Block K.: Nox as a target for diabetic complications. *Clin Sci (Lond)*. 2013; 125: 361–382. doi: 10.1042/CS20130065.
58. Thallas-Bonke V., Jha J.C., Gray S.P., et al.: Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- $\alpha$ -associated mechanisms in diabetic nephropathy. *Physiol Rep.* 2014; 2: e12192. doi: 10.14814/phy2.12192.
59. Wang G., Lai F.M., Lai K.B., Chow K.M., Li K.T., Szeto C.C.: Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract*. 2007; 106: 169–179.
60. Zhao L., Wu F., Jin L., et al.: Serum CXCL16 as a novel marker of renal injury in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2014; 9: e87786. doi: 10.1371/journal.pone.0087786.
61. Xu X., Xiao L., Xiao P.: A glimpse of matrix metalloproteinases in diabetic nephropathy. *Curr Med Chem*. 2014; 21: 3244–3260.
62. Fiorentino L., Cavalera M., Mavilio M., et al.: Regulation of TIMP3 in diabetic nephropathy: a role for microRNAs. *Acta Diabetol*. 2013; 50: 965–969.
63. Bramham K., Mistry H.D., Poston L., Chappell L.C., Thompson A.J.: The noninvasive biopsy—will urinary proteomics make the renal tissue biopsy redundant? *QJM*. 2009; 102: 523–538. doi: 10.1093/qjmed/hcp071.
64. Rossing K., Mischak H., Dakna M., et al.: Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 1283–1290. doi: 10.1681/ASN.2007091025.

#### **4. Artykuł nr 2**

Gala-Błędzińska A., Żylka A., Rybak K., Dumnicka P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Usefulness of measuring urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and calculating NGAL to creatinine ratio as early predictors of kidney dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diagn Lab.* 2015; 51: 97-104.

## **Użyteczność lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilów (NGAL) i wyliczanego wskaźnika NGAL do kreatyniny w moczu jako wczesnych predyktorów uszkodzenia nerek u pacjentów z cukrzycą typu 2**

**Usefulness of measuring urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)  
and calculating NGAL to creatinine ratio as early predictors of kidney dysfunction in  
patients with type 2 diabetes**

Agnieszka Gala-Błędzińska<sup>1</sup>, Agnieszka Żyłka<sup>1</sup>, Katarzyna Rybak<sup>1</sup>, Paulina Dumnicka<sup>2</sup>,  
Marek Kuźniewski<sup>3</sup>, Beata Kuśnierz-Cabala<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Poradnia Nefrologiczna Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Św. Królowej Jadwigi w Rzeszowie

<sup>2</sup>Zakład Diagnostyki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

<sup>3</sup>Klinika i Katedra Nefrologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

<sup>4</sup>Zakład Diagnostyki Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

### **Streszczenie**

Celem badania była ocena użyteczności pomiarów stężenia NGAL w pierwszej porannej porcji moczu oraz wyliczania wskaźnika NGAL/kreatynina (uNGAL/uCr) u chorych z wczesną cukrzycową chorobą nerek (CChN) rozwijającą się w przebiegu cukrzycy typu 2 (DMt2; *diabetes mellitus type 2*) oraz poszukiwanie zależności pomiędzy wartościami tych markerów a rutynowo ocenianymi parametrami biochemicznymi i morfologicznymi.

**Materiał i metody:** Badaniem objęto 55 chorych z CChN w przebiegu DMt2 oraz 22 osoby bez cukrzycy; do badania kwalifikowano pacjentów z szacowaną filtracją kłębuzkową  $>60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  bez cech jawnego białkomoczu. Stężenie uNGAL oznaczano przy użyciu metody chemiluminescencyjnej z mikrocząsteczkami (CMIA) na analizatorze ARCHITECT (Abbott Diagnostics).

**Wyniki.** W grupie badanej obserwowano wyższe wartości wskaźnika uNGAL/uCr niż w grupie kontrolnej (medianą 21,3 vs. 12,2  $\mu\text{g}/\text{g}$ ;  $p=0,014$ ). W grupie badanej wyższe wartości uNGAL/uCr wykazano u kobiet w porównaniu z mężczyznami (38,6 vs. 11,7  $\mu\text{g}/\text{g}$ ;  $p=0,001$ ). W grupie badanej i kontrolnej stężenie uNGAL dodatnio korelowało ze stężeniem kreatyniny w moczu. W grupie badanej zaobserwowano dodatnie korelacje między uNGAL i uNGAL/uCr, a albuminurią i wskaźnikiem albumina/kreatynina (UACR; *urine albumin to creatinine ratio*); w grupie kontrolnej istotna statystycznie była jedynie korelacja uNGAL z albuminurią. Dodatkowo w grupie badanej wykazano dodatnie korelacje między uNGAL i uNGAL/uCr, a stężeniem cholesterolu całkowitego i LDL oraz triglicerydów w surowicy. W analizie regresji wielokrotnej istotnymi predyktorami uNGAL w grupie badanej były albuminuria i stężenie LDL-cholesterolu w surowicy, zaś wskaźnika uNGAL/uCr – UACR i stężenie triglicerydów.

**Wnioski.** Uzyskane wyniki wskazują na użyteczność oznaczania uNGAL i wyliczania uNGAL/uCr jako wczesnych wskaźników uszkodzenia nerek u chorych z DMt2. Wyniki badania wymagają potwierdzenia w większej grupie chorych.

### **Summary**

The aim of the study was to assess the usefulness of measuring concentrations of NGAL in first morning urine and calculating NGAL/creatinine ratio (uNGAL/uCr) among patients with early stage diabetic kidney disease (DKD) in course of type 2 diabetes (DMt2) and to assess the correlations between these markers and routine biochemical and blood count parameters.

**Material and Methods:** The studied group consisted of 55 patients with DKD in course of DMt2 and 22 controls without diabetes; the study included patients with estimated glomerular filtration rate  $>60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  without overt proteinuria. NGAL was measured with chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) with ARCHITECT analyzer (Abbott Diagnostics).

**Results:** Studied group had higher values of uNGAL/uCr than controls (median 21.3 vs. 12.2  $\mu\text{g}/\text{g}$ ;  $p=0.014$ ). Among studied group, women presented higher uNGAL/uCr comparing to men (38.6 vs. 11.7  $\mu\text{g}/\text{g}$ ;  $p=0.001$ ). Both in patients and controls, uNGAL concentrations were positively correlated with urine creatinine. In studied group, we observed positive correlations of uNGAL and uNGAL/uCr with urine albumin and albumin/creatinine ratio (UACR); in control group, only the correlation between uNGAL and albuminuria was statistically significant. Additionally, in studied group, positive correlations were observed between uNGAL and uNGAL/uCr and serum

cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides concentrations. In multiple regression, albuminuria and LDL-cholesterol significantly predicted uNGAL and UACR and triglycerides significantly predicted uNGAL/uCr in the studied group.

Conclusions: The obtained results confirm the usefulness of measuring uNGAL and calculating uNGAL/uCr as early markers of kidney dysfunction in patients with DMt2. The results of the study should be confirmed in larger group of patients.

**Słowa kluczowe:** cukrzycowa choroba nerek, biomarker, lipokalina związana z żelatyną neutrofilu

**Key words:** diabetic kidney disease, biomarker, neutrophil gelatinase-associated lipocalin

## Wstęp

Pomimo postępu jaki dokonał się w medycynie w ciągu ostatnich 20 lat w zakresie diagnostyki i leczenia cukrzycowej choroby nerek (CChN), stanowi ona najczęstszą przyczynę rozwoju przewlekłej choroby (PChN) oraz niewydolności nerek [1]. Dane epidemiologiczne szacują liczbę chorych na cukrzycę w Polsce na ok. 2 miliony osób, z czego blisko połowa nie ma świadomości bycia chorym, żyjąc z nieroznianą i nieleczoną cukrzycą [2]. Przy założeniu, że jedynie u 20% istnieje zwiększone ryzyko rozwoju CChN, blisko 400 000 osób jest zagrożonych ujawnieniem się tego powikłania. Uszkodzenie nerek w przebiegu DMt2 jest często nieodwracalne, szczególnie jeśli towarzyszy mu spadek filtracji kłębusskowej i wzrastająca albuminuria. Wczesne wykrycie oraz rozpoczęcie leczenia jest bardzo istotne dla przebiegu klinicznego nefropatii u pacjentów z DMt2 [3,4].

W 2002 r. w USA ukazały się zalecenia Amerykańskiej Narodowej Fundacji Chorób Nerek (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, NKF KDOQI) dotyczące klasyfikacji, oceny oraz stratyfikacji PChN [5]. W opracowaniu tej klasyfikacji wykorzystano ocenę filtracji kłębusskowej oraz obecność markerów uszkodzenia nerek. Za prawidłową albuminurię arbitralnie uznano wydalanie poniżej 30 mg albuminy na dobę. W wytycznych KDOQI wprowadzono również po raz pierwszy rozpoznanie cukrzycowej choroby nerek, które zastąpiło dotychczasowy termin nefropatia cukrzycowa.

W celu określenia stadium zaawansowania CChN, w grupie chorych z DMt2, Polskie Towarzystwo Diabetologiczne (PTD) zaleciło od 2010 r. wykonywanie pomiaru wskaźnika albumina/kreatynina w pojedynczej porcji moczu (UACR; *Urinary Albumin to Creatinine Ratio*), pomiar stężenia kreatyniny w surowicy oraz ocenę wielkości przesączania kłębusskowego (GFR) w chwili rozpoznania cukrzycy u chorego [6].

Z uwagi na złożony patomechanizm zmian w nerkach w przebiegu DMt2 trwają intensywne poszukiwania nowych biomarkerów wczesnego uszkodzenia nerek, które mogłyby pełnić rolę prognostyczną w ocenie zaawansowania CChN.

Obiecującymi parametrami diagnostycznymi w tym zakresie wydają się być NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), KIM-1 (*kidney injury molecule -1*), czy L-FABP (*liver-type fatty acid binding protein*) [3, 4]. W warunkach fizjologicznych, NGAL jest białkiem o masie cząsteczkowej 25 kDa wydzielanym w niewielkich ilościach przez nerki, tchawicę, płuca, żołądek oraz jelito grube, a jego ekspresja zwiększa się w znaczący sposób w przebiegu procesu zapalnego oraz w uszkodzeniach śródłonka [3, 4, 7]. NGAL ulega swobodnej filtracji przez kłębuzek nerkowy, po czym jest całkowicie resorbowany w cewce proksymalnej w mechanizmie

endocytozy zależnej od megaliny. Jako biomarker uszkodzenia nerek, NGAL odkryty został w 2003 r. [8]. Następnie badania Yang et al. [9] wykazały wyraźny wzrost NGAL w moczu (uNGAL) u chorych z CChN w przebiegu DMt2. W kolejnych badaniach Bolignano et al. [10] potwierdzono, że stężenie NGAL w surowicy i w moczu wzrasta zależnie od zaawansowania CChN u chorych z „normo-albuminurią” i „mikroalbuminurią”. Zaobserwowano również, że zwiększone wydalanie NGAL z moczem jest wskaźnikiem obnizania się filtracji kłębusskowej (eGFR) u chorych z DMt2 zarówno z „mikro”, jak i „makroalbuminurią”. Chociaż aktualnie obowiązuje nomenklatura określająca oba te stany jako albuminurię, „mikroalbuminurię” rozpoznaje się, gdy wydalanie albuminy mieści się w zakresie od 30 do 300 mg na dobę, natomiast „makroalbuminurię”, gdy wydalanie albuminy przekracza 300 mg na dobę, niezależnie od płci [11].

Fu et al. [12] zaobserwowali ponadto, że w stosunkowo krótkim czasie trwania cukrzycy dochodzi do uszkodzenia cewek nerwowych, a pomiar uNGAL może okazać się jednym z najwcześniej-szych wskaźników uszkodzenia nerek w DMt2, wyprzedzającym wzrost UACR. Również w badaniu Wu et al. [13] wykazano korelację pomiędzy stężeniem uNGAL oraz spadkiem eGFR i nasileniem albuminurii u chorych z DMt2 [4].

Celem badania była ocena użyteczności pomiarów stężenia uNGAL i wyliczania wskaźnika uNGAL/uCr w pierwszej porannej porcji moczu u chorych z CChN rozwijającą się w przebiegu DMt2. Dodatkowo autorzy poszukiwali zależności pomiędzy stężeniami uNGAL i wartościami wyliczonego uNGAL/uCr a wybranymi parametrami biochemicznymi i morfologicznymi ocenianymi rutynowo u pacjentów leczonych w Poradni Nefrologicznej Wojewódzkiego Szpitala Klinicznego Nr 2 im Królowej Jadwigi w Rzeszowie.

## Materiał i metody

Badaniem objęto łącznie 55 chorych leczonych w Poradni Nefrologicznej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Królowej Jadwigi w Rzeszowie. Grupę chorych stanowiło 29 (53%) kobiet w wieku średnim  $63 \pm 14$  lat oraz 26 (47%) mężczyzn w wieku  $57 \pm 15$  lat. Kryterium włączenia do badania obejmowało: pacjentów ze zdiagnozowaną DMt2 w wieku powyżej 18 roku życia, z szacowaną filtracją kłębusskową (eGFR) powyżej  $60 \text{ ml/min}/1,73\text{m}^2$  bez cech jawnego białkomoczu. Obecność DMt2 stwierdzano na podstawie dostępnej dokumentacji lekarskiej lub na podstawie przeprowadzonego doustnego testu obciążenia 75g glukozy – OGTT (*Oral Glucose Tolerance Test*). Do badania nie zakwalifikowano chorych, którzy nie wyrazili świadomej zgody na udział w badaniu potwierzonej własnoręcznym podpisem, a także chorych u których stosowano leki potencjalnie nefrotoksyczne, z innymi

schorzeniami nerek, zakażeniem dróg moczowych, zakażeniem ogólnoustrojowym, chorobami nowotworowymi, alergicznymi, niedokrwistością, chorobą tkanki łącznej oraz nieustabilizowanym ciśnieniem tętniczym ( $\geq 140/90$  mmHg).

Dodatkowo w celu porównania analizowanych zmian utworzono 22 osobową grupę kontrolną bez cukrzycy, zbliżoną klinicznie pod względem schorzeń współistniejących do grupy badanej. Badania laboratoryjne wykonywane były w Klinicznym Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Św. Królowej Jadwigi w Rzeszowie u wszystkich pacjentów oraz w grupie kontrolnej.

Materiał do badania stanowiła próbki krwi pełnej pobranej na wersenian, próbki surowicy oraz poranne próbki moczu uzyskane od pacjentów w ramach prowadzonej rutynowej kontroli stanu chorego. Krew pobierano przez nakłucie żyły łokciowej wykorzystując system próżniowy firmy Sarstedt. Badanie morfologii krwi oraz badanie HbA<sub>1c</sub> wykonywano we krwi pełnej pobranej na wersenian (K<sub>2</sub>EDTA). W przypadku badań biochemicznych surowicę uzyskiwano w wyniku 10 minutowego wirowania krwi z prędkością 4000 obrotów/min. Panel rutynowych badań biochemicznych obejmował takie parametry jak: białko C-reaktywne (CRP), pełny profil lipidowy oraz stężenie kreatyniny z wyliczeniem eGFR CKD-EPI. Porównanie średnich wartości ocenianych rutynowo parametrów laboratoryjnych w grupie badanej oraz kontrolnej przedstawiono w tabeli I.

Stężenie NGAL, albuminy i kreatyniny w moczu oraz badanie ogólne moczu wykonywano w pierwszej porannej porcji moczu. W oparciu o wartości stężeń albuminy i kreatyniny wyliczano

wskaźnik albumina/kreatynina (UACR). Analogicznie w przypadku uNGAL oraz kreatyniny wyliczano wskaźnik uNGAL/uCr. Badanie ogólne moczu wykonywano przy użyciu analizatora Labumat Urised 2. Stężenie uNGAL oznaczano przy użyciu metody wykorzystującej chemiluminescję z mikrocząsteczkami CMIA (chemiluminescent microparticle immunoassay) na platformie ARCHITECT Analyzer firmy Abbott Diagnostics (Abbott Park, USA). Stężenie albuminy w porannej porcji moczu oznaczano metodą immunoturbidometryczną, natomiast stężenie kreatyniny metodą enzymatyczną przy użyciu analizatora biochemicalnego Olimpus AU680. Do badania morfologii krwi obwodowej wykorzystano analizator hematologiczny ADVIA 2120i firmy Siemens (Siemens Healthcare Diagnostic, Niemcy).

Projekt badawczy posiadał zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie (Nr 40/2013/B).

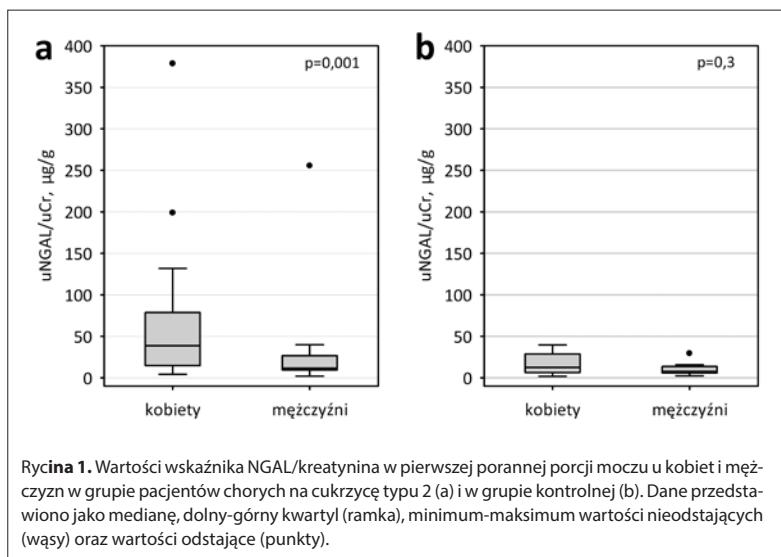
#### Analiza statystyczna

Analizowane dane przedstawiono jako liczbę chorych (odsetek grupy) dla zmiennych nominalnych oraz medianę (dolny-górny kwartyl) lub średnią  $\pm$  odchylenie standardowe dla zmiennych ciągłych (odpowiednio dla rozkładu różnego i zbliżonego do normalnego). Normalność rozkładów oceniano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Do oceny różnic pomiędzy dwoma grupami stosowano test u Manna-Whitney'a lub test t Studenta dla zmiennych niepowiązanych. Do badania korelacji wykorzystano współczynnik Pearsona po zlogarytmowaniu zmiennych o rozkładzie prawoskórnym. W analizie regresji wielokrotnej jako zmienne niezależne wykorzystano zmienne, które wykazywały istotne

Tabela I. Porównanie danych klinicznych oraz parametrów biochemicznych i hematologicznych w grupie badanej i kontrolnej.

Parametr badany	Grupa badana n=55	Grupa kontrolna n=22	<b>p</b>
kobiety/mężczyźni [N (%)]	29 (53) / 26 (47)	13 (59) / 9 (41)	
wiek [lata]	63 $\pm$ 14	57 $\pm$ 15	0,06 <sup>NS</sup>
nadciśnienie tętnicze, N (%)	40 (73)	15 (68)	0,5 <sup>NS</sup>
choroba niedokrwienienna serca [N (%)]	17 (31)	3 (14)	0,1 <sup>NS</sup>
niewydolność serca [N (%)]	6 (11)	3 (14)	0,7 <sup>NS</sup>
kreatynina w surowicy [ $\mu\text{mol/l}$ ]	64,2 (58,9-77,4)	70,4 (69,5-79,2)	0,046
cukrzyca świeżo wykryta [n (%)]	17 (31)	--	--
czas trwania cukrzycy [lata]	6,0 (1-10)	--	--
BMI [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]	31,4 $\pm$ 6,1	28,4 $\pm$ 5,8	0,040
eGFR (CKD-EPI) [ $\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ]	91 (77,0-99,0)	86 (77,0-97,0)	0,6 <sup>NS</sup>
eGFR [ $\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ] 60-90 / >90 [N (%)]	30 (55) / 25 (45)	10 (45) / 12 (55)	0,5 <sup>NS</sup>
WBC [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]	7,51 $\pm$ 2,23	6,31 $\pm$ 1,42	0,022
HGB [g/dl]	14,1 $\pm$ 1,3	14,0 $\pm$ 1,1	0,7 <sup>NS</sup>
HbA <sub>1c</sub> [%]	8,1 $\pm$ 2,0	--	--
cholesterol całkowity [ $\text{mmol/l}$ ]	5,3 $\pm$ 1,4	5,7 $\pm$ 1,5	0,3 <sup>NS</sup>
cholesterol-LDL [ $\text{mmol/l}$ ]	3,2 $\pm$ 1,2	3,9 $\pm$ 1,2	0,06 <sup>NS</sup>
cholesterol-HDL [ $\text{mmol/l}$ ]	1,2 $\pm$ 0,31	1,3 $\pm$ 0,3	0,041
triglicerydy [ $\text{mmol/l}$ ]	1,8 (1,2-2,7)	1,5 (1,0-1,9)	0,09 <sup>NS</sup>
kreatynina w moczu [g/l]	1,06 (0,62-1,65)	1,40 (0,71-2,24)	0,3 <sup>NS</sup>
uNGAL [ $\mu\text{g/l}$ ]	20,3 (9,9-42,6)	10,9 (6,0-38,2)	0,1 <sup>NS</sup>
uNGAL/uCr [ $\mu\text{g/g}$ ]	21,3 (10,0-51,9)	12,2 (5,9-27,9)	0,014
albuminuria [mg/l]	10,0 (6,6-18,2)	5,9 (3,0-22,9)	0,1 <sup>NS</sup>
UACR [mg/g]	8,9 (4,2-19,8)	6,0 (3,6-9,0)	0,08 <sup>NS</sup>

<sup>NS</sup>wartość nieznamieniona statystycznie; WBC – całkowita liczba krwinek białych; HGB – stężenie hemoglobiny; uNGAL – stężenie NGAL w pierwszej porannej porcji moczu; UACR – wskaźnik albumina/kreatynina w moczu



Rycina 1. Wartości wskaźnika NGAL/kreatynina w pierwszej porannej porcji moczu u kobiet i mężczyzn w grupie pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 (a) i w grupie kontrolnej (b). Dane przedstawiono jako medianę, dolny-górny kwartyl (ramka), minimum-maksimum wartości nieodstających (wąsy) oraz wartości odstające (punkty).

statystycznie korelacje ze zmiennymi zależnymi, z pominięciem predyktorów nadmiarowych. Za znamienne statystycznie uznano wyniki przy  $p<0,05$ .

## Wyniki

W grupie badanej obserwowano wyższe stężenia uNGAL w porównaniu z grupą kontrolną, jednak istotną statystycznie różnicę zaobserwowano tylko dla wskaźnika uNGAL/uCr (tabela I). W grupie kontrolnej maksymalna wartość wskaźnika uNGAL/uCr wynosiła 39,6 µg/g, zaś wartość 95. percentyla wyniosła 38,0 µg/g. W grupie badanej u 37 pacjentów (67%) wskaźnik uNGAL/uCr

wynosił poniżej 38 µg/g, u pozostałych pacjentów ( $N=18$ ; 33%) wykazano wyższe wartości, znacznie (nawet 10-krotnie) przekraczające wartość 95. centyla w grupie kontrolnej (maksimum w grupie badanej: 378,6 µg/g).

W grupie badanej obserwowano wyższe wartości uNGAL/uCr u kobiet w porównaniu z mężczyznami (mediana 38,6 vs. 11,7 µg/g;  $p=0,001$ ; Rycina 1), natomiast w grupie kontrolnej różnica nie była istotna statystycznie (mediana 12,5 µg/g u kobiet i 7,7 µg/g u mężczyzn;  $p=0,3$ ). Nie zaobserwowano znamiennych różnic związanych z płcią dotyczących nieskorygowanego stężenia uNGAL (mediana odpowiednio u kobiet i mężczyzn: 21,1 i 17,8 µg/g;  $p=0,1$  w grupie badanej oraz 10,5 i 20,1 µg/g;  $p=0,2$  w grupie kontrolnej).

Korelacje stężenia uNGAL i wskaźnika uNGAL/uCr w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono w Tabeli II. Nie wykazano istotnych korelacji między uNGAL i uNGAL/uCr a wiekiem pacjentów, zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej. Nie stwierdzono również korelacji z liczbą leukocytów i stężeniem hemoglobiny we krwi obwodowej. Stężenie uNGAL dodatnio korelowało ze stężeniem kreatyniny w moczu w obu grupach pacjentów. Stężenie kreatyniny w surowicy korelowało ujemnie z wartością wskaźnika uNGAL/uCr jedynie u pacjentów z cukrzycą, natomiast w obu grupach nie wykazano znamiennych statystycznie korelacji uNGAL i uNGAL/uCr z eGFR. W grupie badanej zaobserwowano dodatnie korela-

Tabela II. Analiza zależności pomiędzy stężeniem uNGAL i uNGAL/uCr oraz wybranymi parametrami w grupie badanej i kontrolnej.

	grupa badana n=55		grupa kontrolna n=22	
	ln (uNGAL)	ln (uNGAL/uCr)	ln (uNGAL)	ln (uNGAL/uCr)
wiek	R=-0,01 $p=0,9^{\text{NS}}$	R=0,16 $p=0,2^{\text{NS}}$	R=0,12 $p=0,6^{\text{NS}}$	R=0,33 $p=0,1^{\text{NS}}$
WBC	R=0,01 $p=0,9^{\text{NS}}$	R=0,04 $p=0,6^{\text{NS}}$	R=0,20 $p=0,4^{\text{NS}}$	R=0,30 $p=0,2^{\text{NS}}$
HGB	R=-0,08 $p=0,5^{\text{NS}}$	R=-0,16 $p=0,2^{\text{NS}}$	R=-0,01 $p=0,9^{\text{NS}}$	R=-0,29 $p=0,2^{\text{NS}}$
ln (kreatynina w moczu)	R=0,30 $p=0,028$	R=-0,34 $p=0,012$	R=0,62 $p=0,002$	R=-0,08 $p=0,7^{\text{NS}}$
ln (kreatynina w surowicy)	R=-0,21 $p=0,1^{\text{NS}}$	R=-0,33 $p=0,013$	R=-0,24 $p=0,3^{\text{NS}}$	R=-0,25 $p=0,3^{\text{NS}}$
ln (eGFR)	R=0,03 $p=0,8^{\text{NS}}$	R=0,06 $p=0,7^{\text{NS}}$	R=0,22 $p=0,3^{\text{NS}}$	R=-0,12 $p=0,6^{\text{NS}}$
ln (albuminuria)	R=0,55 $p<0,001$	R=0,32 $p=0,016$	R=0,63 $p=0,002$	R=0,17 $p=0,4^{\text{NS}}$
ln (UACR)	R=0,36 $p=0,007$	R=0,54 $p<0,001$	R=0,38 $p=0,08^{\text{NS}}$	R=0,32 $p=0,1^{\text{NS}}$
cholesterol całkowity	R=0,26 $p=0,061^{\text{NS}}$	R=0,33 $p=0,014$	R=0,26 $p=0,3^{\text{NS}}$	R=0,14 $p=0,6^{\text{NS}}$
cholesterol-LDL	R=0,32 $p=0,025$	R=0,45 $p=0,001$	R=-0,03 $p=0,6^{\text{NS}}$	R=0,21 $p=0,4^{\text{NS}}$
cholesterol-HDL	R=0,04 $p=0,8^{\text{NS}}$	R=0,10 $p=0,5^{\text{NS}}$	R=-0,03 $p=0,9^{\text{NS}}$	R=0,18 $p=0,5^{\text{NS}}$
ln (triglicerydy)	R=0,37 $p=0,008$	R=0,42 $p=0,002$	R=0,13 $p=0,6$	R=-0,12 $p=0,6$

ln – logarytm naturalny; pozostałe skróty jak w Tabeli I

cej między uNGAL i uNGAL/uCr, a albuminurią i UACR (Rycina 2), w grupie kontrolnej istotna statystycznie była jedynie korelacja uNGAL z albuminurią. Dodatkowo w grupie badanej wykazano dodatnie korelacje między uNGAL i uNGAL/uCr, a stężeniem cholesterolu całkowitego i LDL oraz triglicerydów w surowicy.

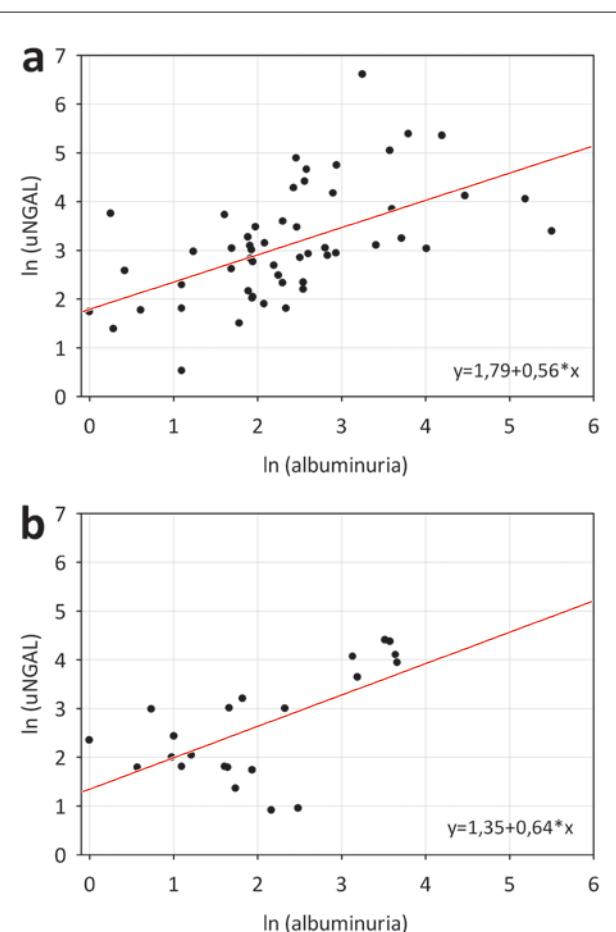
Czas trwania cukrzycy oraz stężenie HbA<sub>1c</sub> w grupie badanej nie korelowały z uNGAL i uNGAL/uCr.

W analizie regresji wielokrotnej (Tabela III) istotnymi predyktorami uNGAL w grupie badanej były albuminuria i stężenie LDL-cholesterolu w surowicy, zaś wskaźnika uNGAL/uCr – UACR i stężenie triglicerydów.

### Dyskusja

Od końca lat 50-tych XX wieku oznaczanie stężenia kreatyniny w surowicy krwi uważane jest za standard diagnostyczny w ocenie funkcji nerek, jednak wpływ wieku, płci, masy ciała pacjenta, czy wzrost stężenia opóźniony o kilkadziesiąt godzin w stosunku do działania czynnika uszkadzającego nerki, wpływają na ograniczenie jego przydatności w niektórych sytuacjach klinicznych [14]. Stwarza to zapotrzebowanie na poszukiwanie nowego biomarkera, niezależnego od wymienionych cech, a także prostego do oznaczania przy pomocy metod rutynowo stosowanych w laboratorium, powtarzanego, o dużej czułości dla rozpoznawania niewielkich nawet patologii narządu.

U chorych z PChN w stadium od 2 do 4 obserwowane są wzrosty stężenia NGAL w moczu i w surowicy [15, 16, 17]. Autorzy poddali analizie zmiany stężenia uNGAL oraz wskaźnika uNGAL/uCr u chorych z DMt2 zagrożonych rozwojem CChN, a następnie porównali je z danymi uzyskanymi w grupie kontrolnej. Chociaż brak konsensusu, czy oznaczać jedynie całkowite stężenie NGAL w moczu, czy też opierać się na wyliczeniach wskaźnika uNGAL/uCr, ze względu na wykazaną w badaniach Helmersson [18] dużą zmienność biologiczną NGAL, u chorych z PChN pochodzenia cewkowego zaleca się stosowanie obu wskaźników. W grupie badanej stężenia uNGAL były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną, choć różnice istotne statystycznie obserwowano jedynie dla wskaźnika uNGAL/uCr. Wyniki te były zgodne z obserwacjami przeprowadzonymi przez innych autorów w grupie z DMt2 [10, 11, 13]. W toku badania wykazano, że stężenia uNGAL oraz uNGAL/uCr korelowały dodatnio ze stężeniem albuminy w moczu i wskaźnikiem UACR w całej badanej grupie. Zwiększone wydalanie albuminy z moczem pozostaje uznawanym czynnikiem ryzyka PChN oraz CChN,



Rycina 2. Zależność między stężeniem NGAL w pierwszej porcji moczu, a albuminurią w grupie badanej (a) i kontrolnej (b). W prawym dolnym rogu wykresów podano równania regresji.

stąd wykazanie dodatniej korelacji pomiędzy uNGAL i uNGAL/uCr w moczu oraz albuminą potwierdza, że badane wskaźniki mogą zostać uznane za wyznaczniki uszkodzenia nerek u chorych z DMt2 [19,20]. W badaniu Bolignano et al. [10] przeprowadzonym w grupie chorych z DMt2 zauważono, że stężenie NGAL oznaczane zarówno w moczu, jak i w surowicy jest lepszym wskaźnikiem progresji PChN, w porównaniu z eGFR w okresie 18,5 miesięcznej obserwacji. Również inne badania potwierdzają istnienie korelacji pomiędzy NGAL oraz gorszym przebiegiem PChN i spadkiem eGFR [4, 21, 22, 23]. Publikacje poświęcone NGAL podkreślają związek lipokaliny 2 z układem immunologicznym, zjawiskiem oporności na insulinę oraz procesami zapalnymi szczególnie

Tabela III. Analiza regresji wielokrotnej w przewidywaniu uNGAL i uNGAL/uCr w grupie badanej.

zmienne niezależne	In (uNGAL)		In (uNGAL/uCr)	
	skorygowany $R^2=0,50$ ; $p<0,001$	$\beta \pm SE$	skorygowany $R^2=0,54$ ; $p<0,001$	$\beta \pm SE$
płeć żeńska	--	--	0,15 ± 0,13	0,3 <sup>NS</sup>
In (kreatynina w moczu)	0,12 ± 0,13	0,3 <sup>NS</sup>	-0,09 ± 0,11	0,4 <sup>NS</sup>
In (kreatynina w surowicy)	--	--	-0,18 ± 0,13	0,2 <sup>NS</sup>
In (albuminuria)	0,50 ± 0,13	<0,001	--	--
In (UACR)	--	--	0,37 ± 0,12	0,004
cholesterol-LDL	0,25 ± 0,12	0,038	0,19 ± 0,11	0,1 <sup>NS</sup>
In (triglicerydy)	0,22 ± 0,12	0,08 <sup>NS</sup>	0,27 ± 0,12	0,027

SE – błąd standardowy; pozostałe skróty jak w Tabeli I i II

analizując ich wpływ na przebieg CChN [7, 9, 10]. Uogólniony proces zapalny oraz niedokrwistość mogą prowadzić do wzrostu stężenia NGAL, jest to bowiem białko uwalniane z neutrofil i makrofagów, a jego podstawowa funkcja biologiczna związana jest z regulacją gospodarki żelazem [24]. Autorzy pracy nie zaobserwowali wpływu liczby leukocytów, czy stężenia hemoglobiny na stężenie uNGAL oraz wielkość uNGAL/uCr. Badania Chou et al. [3] podkreślają diagnostyczne znaczenie wysokich stężeń krążącego NGAL, który odzwierciedla przewlekły proces zapalny w przebiegu PChN. NGAL bywa również określany jako predyktor obniżającej się wartości eGFR u pacjentów z DMt2 [3].

Pomiary stężeń uNGAL oraz wartość wyliczonego wskaźnika uNGAL/uCr mogą dostarczyć informacji na temat uszkodzenia nerki i zmieniają się dynamicznie w czasie wraz ze wzrostem stopnia tego uszkodzenia.

Stężenia cholesterolu we frakcji LDL korelowały z uNGAL, zaś trigliserydów ze wskaźnikiem uNGAL/uCr w grupie chorych na DMt2. Ponadto, oba wskaźniki korelowały z UACR. Wyniki te mogą wskazywać na wpływ aterogennego lipidogramu w grupie z DMt2 na progresję uszkodzenia nerek u chorych z albuminurią >30mg/g. Obserwacja ta jest spójna z badaniem Gall i wsp. [25], w którym wykazano korelację między stężeniem cholesterolu w surowicy a progresją CChN szacowanej wartością eGFR. Istnieje pogląd, że dyslipidemia przyspiesza postęp PChN, jaką jest CChN. Proces ten rozpoczyna się od uszkodzenia włośniczek kłębuszka nerkowego, które umożliwia infiltrację mezangium lipoproteinami [26]. Prawdopodobne jest, że ten proces, zainicjowany przez hiperlipidemię, leży u podłożu zapalenia śródmiąższu nerek u chorych z DMt2 z konsekwencjami pod postacią postępującego uszkodzenia nerek.

Wskaźniki uNGAL i uNGAL/uCr u chorych bez aktywnego zakażenia, istotnej niedokrwistości, choroby nowotworowej i chorób autoimmunologicznych wykazują wysoką specyficzność dla uszkodzenia nerek. Potwierdza to wykazana przez autorów dodatnia korelacja pomiędzy ich wartościami, a albuminurią i UACR (wskaźniki uznawane za markery specyficzne dla uszkodzenia nerek).

DMt2 jest uznawana za schorzenie cywilizacyjne, co za tym idzie, istnieje coraz większa świadomość rozwoju jej późnych powikłań oraz stosunkowo łatwy dostęp do wczesnej diagnostyki. Rozumienie istoty jej przewlekłego i postępującego charakteru powinna skłaniać badaczy do poszukiwania takich właśnie narzędzi diagnostycznych, jakimi w opinii autorów pracy mogłyby stać się rutynowe stosowanie pomiarów NGAL w moczu. Brak wyraźnego momentu rozpoczęcia DMt2, nierazdrok zbyt długi okres czasu do jej rozpoznania i podjęcia leczenia, wymaga wdrożenia właściwego narzędzia do oceny progresji CChN. Ustalenie wartości wyjściowej uNGAL i ocena wielkości uNGAL/uCr, a następnie monitorowanie zmiany ich stężenia podczas okresowego badania kontrolnego prowadzonego w Poradni Nefrologicznej może znaczco przyczynić się do obniżenia liczby pacjentów kierowanych w przyszłości do leczenia nerkozastępczego z powodu powikłań DMt2.

## Piśmiennictwo

- Collins AJ, Foley RN, Herzog Ch, et al. United States Renal Data System 2012 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in United States. Am J Kidney Dis 2013; 62: 1023-1230.
- Szurkowska M, Szybiński Z, Nazim A, i wsp. Chorobowość z powodu cukrzycy typu 2 w populacji Krakowa. Pol Arch Med Wewn 2001; 106: 771-779.
- Chou KM, Lee CC, Chen CH, et al. Clinical value of NGAL, L-FABP and albuminuria in predicting GFR decline in type 2 diabetes mellitus patients. PLOS One 2013; 8: e54863.
- Al-Refaie AA, Tayel SI, Ragheb A et, al. Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin as a marker of tubular damage in type 2 diabetic patients with and without albuminuria. Open J Nephrol 2014; 4: 37-46.
- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Am J Kidney Dis 2002; 39: 1-266.
- Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2010. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Diabetologia Praktyczna 2010; 11: supl. A.
- Helanova K, Spinar J, Parenica J. Diagnostic and prognostic utility of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in patients with cardiovascular disease -review. Kidney Blood Press Res 2014; 39: 623-629.
- Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 2534-2543.
- Yang YH, He XJ, Chen SR, et al. Changes of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in type-2 diabetic patients with nephropathy: one year observational follow-up study. Endocrine 2009; 36: 45-51.
- Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. Kidney Blood Press Res 2009; 32: 91-98.
- K/DQOI clinical practice guidelines and clinical practice recommendation for diabetes and chronic kidney disease. Am J Kidney Dis 2007; 49: 12-154.
- Fu WJ, Xiong S, Fang Y, et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. Endocrine 2012; 41: 82-88.
- Wu J, Ding Y, Zhu C, et al. Urinary TNF-a and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. Exp Ther Med 2013; 6: 1482-1488.
- Gala-Błędzińska A, Kuźniewski M. Oznaczanie lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilu (NGAL) w praktyce klinicznej. Przegl Lek 2013; 70: 400-403.
- Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol 2009; 4: 337-344.
- Malyszko J, Bachorzewska-Gajewska H, Sitniewska E, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in non-diabetic patients with stage 2-4 chronic kidney disease. Ren Fail 2008; 30: 625-628.
- Nishida M, Kawakatsu H, Okumura Y, et al. Serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in children with chronic renal disease. Pediatr Int 2010; 52: 563-568.
- Helmersson-Karlqvist J. Day-to-day variation of urinary NGAL and rational for creatinine correction. Clin Bioch 2013; 46: 70-72.
- KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Inter 2013; 3.
- Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Diabetologia Kliniczna 2014; 3: supl. A.
- Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin. Curr Opin Crit Care 2010; 16: 526-532.
- Hall IE, Yarlagadda SG, Coca SG, et al. IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after Sidney transplantation. J Am Soc Nephrol 2010; 21: 189-197.
- Hirsch R, Dent C, Pfriem H et al. NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. Pediatr Nephrol 2007; 22: 2089-2095.
- Grigoryev DN, Liu M, Hassoun HT, et al. The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. J Am Soc Nephrol 2008; 19: 547-558.
- Gall MA, Nielsen FS, Schmidt UM, et al. The course of kidney function in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with diabetic nephropathy. Diabetologia 1993; 36: 1071-1078.
- Moorhead JF, El-Nahas M, Chan MK, et al. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubule-interstitial disease. Lancet 1982; 320: 1309-1311.

**Adres do korespondencji:**

dr hab. n. med. Beata Kuśnierz-Cabala  
Zakład Diagnostyki Katedra Biochemii Klinicznej  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
31-501 Kraków, ul. Kopernika 15A  
Tel. +48 12 424 8365  
email: mbkusnie@cyf-kr.edu.pl

Zaakceptowano do druku: 30.06.2015

## **5. Artykuł nr 3**

Żylka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Dis Markers*. 2016; doi.org/ 10.1155/2016/8489543.

## Research Article

# Is Urinary NGAL Determination Useful for Monitoring Kidney Function and Assessment of Cardiovascular Disease? A 12-Month Observation of Patients with Type 2 Diabetes

Agnieszka Żyłka,<sup>1</sup> Agnieszka Gala-Błędzińska,<sup>1</sup> Paulina Dumnicka,<sup>2</sup> Piotr Ceranowicz,<sup>3</sup> Marek Kuźniewski,<sup>4</sup> Krzysztof Gil,<sup>5</sup> Rafał Olszanecki,<sup>6</sup> and Beata Kuśnierz-Cabala<sup>7</sup>

<sup>1</sup>St. Queen Jadwiga Clinical District Hospital No. 2, Rzeszow, Poland

<sup>2</sup>Department of Medical Diagnostics, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>3</sup>Department of Physiology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>4</sup>Department of Nephrology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>5</sup>Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>6</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>7</sup>Department of Diagnostics, Chair of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

Correspondence should be addressed to Piotr Ceranowicz; [mpcerano@cyf-kr.edu.pl](mailto:mpcerano@cyf-kr.edu.pl)

Received 14 August 2016; Accepted 18 October 2016

Academic Editor: Ying Huang

Copyright © 2016 Agnieszka Żyłka et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background.** Diabetic kidney disease (DKD) may start as glomerular or tubular damage. We assessed kidney function during one-year-long observation of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) after initiation of nephroprotective treatment, with emphasis on the changes in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL), and evaluated the association between tubular damage and cardiovascular complications of T2DM. **Materials and Methods.** Adult T2DM patients (55) were assessed initially and 30 patients after 1 year. Albumin and uNGAL and creatinine were measured in first morning urine. Albumin/creatinine (uACR) and uNGAL/creatinine (uNCR) ratios were calculated. **Results.** In logistic regression, both uACR above 30 mg/g and uNCR the median (21.3 µg/g) were associated with cardiovascular complications, independently of classical risk factors and diabetes duration. One year after initiation of treatment, a significant reduction in HbA<sub>1c</sub> was observed. BMI and lipid profiles did not change. Increase in serum creatinine and reduction in eGFR occurred, along with decrease in uNGAL and uNCR. Increasing uNCR and uACR were associated with higher control HbA<sub>1c</sub>. The increase in uNCR was more frequent in patients with hypertension. **Conclusions.** Better glycemic control in T2DM patients results in improved tubular function, as reflected by reduced uNCR and uNGAL. First morning urine uNGAL and uNCR may be useful to assess renal function and cardiovascular risk, along with albuminuria and eGFR.

## 1. Introduction

The prevalence of diabetes worldwide is over 9 percent, and it is gradually increasing [1]. The World Health Organization (WHO) estimates that, in highly developed countries, 85 percent of population will suffer from type 2 diabetes mellitus (T2DM) [2]. The mortality due to diabetes complications, resulting from diabetic macroangiopathy, microangiopathy, or neuropathy, is an important social and clinical issue.

In accordance with the latest 2016 European Society of Cardiology (ESC) guidelines, diabetic patients are considered to be at a very high or high risk of developing cardiovascular disease (CVD) [3]. It is assumed that 30–35 percent of genetically predestined individuals, receiving no or inadequate treatment, may develop angiopathy in renal microcirculation and diabetic kidney disease [4]. Glomerular filtration rate (GFR) lower than 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> further increases the risk of developing CVD [3]. Available studies clearly point

to increased mortality rate of patients suffering from T2DM associated with nephropathy. However, early recognition of T2DM and adequate treatment inhibit progression of changes in blood vessels and contribute to favorable prognosis [3].

Kidney diseases are diagnosed on the basis of serum creatinine concentration and estimated GFR (eGFR), albuminuria, renal imaging, and histology following renal biopsy. However, low accuracy or invasiveness of these tests causes the fact that they frequently do not meet expectations of clinicians. In accordance with American Diabetes Association (ADA) 2016 standards, in order to detect or assess DKD, urinary albumin excretion and eGFR have to be measured annually [4]. Taking into account a limited diagnostic value of eGFR in detection of early renal dysfunction [5], as well as the fact that not all people with DKD have increased albuminuria, a search for new markers for kidney damage seems necessary. The new markers should be characterized by higher diagnostic sensitivity and specificity and should allow detecting the nonglomerular kidney damage [6–8].

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a member of the lipocalin protein family, has been recognized as one of the most promising biomarkers of early stages of kidney damage. It is a secreted protein with a molecular weight of 25 kDa, found in the neutrophil granules [9]. Recent studies focus mainly on the role of NGAL as a biomarker of acute kidney injury (AKI) [10, 11]. However, NGAL may also serve as a marker of chronic kidney disease (CKD), including DKD [12, 13]. Due to high biological variability of urinary NGAL (uNGAL), in CKD patients, uNGAL measurements should be accompanied by the assessment of urine creatinine concentration and calculation of uNGAL/creatinine ratio (uNCR) [14]. Prospective studies in DKD patients indicated the association between increasing uNGAL and the progression of kidney disease [15, 16] and negative correlation between uNCR and eGFR [16, 17], irrespective of albuminuria, although a positive correlation with albuminuria was also observed in some studies [16]. These observations in T2DM patients encourage the hypothesis that NGAL may be an earlier biomarker of DKD than albuminuria. The measurements of initial values of uNGAL and uNCR, and subsequent regular monitoring of their changes, seem to be useful in the assessment of kidney function in T2DM patients. Promising preliminary results were also obtained in our studies: namely, we found that uNCR exceeding 21.3 µg/g may be useful for early prediction of renal tubular damage in the course of DKD [18].

The aim of the study was to assess the changes in renal function of T2DM patients during a 12-month observation, following the introduction of nephroprotective treatment according to ADA 2016 standards. Special attention was paid to the changes in uNGAL concentrations and uNCR values after treatment. We evaluated the correlations between the changes in markers of kidney function after a year-long treatment and the diabetes duration, blood glucose concentrations, and the use of medications affecting the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and the lipid metabolism. Additionally, the relationship between uACR and uNCR values and cardiovascular complications were assessed at the beginning of the study.

## 2. Materials and Methods

The study group consisted of women and men diagnosed with T2DM and undergoing treatment at the Department of Nephrology at St. Queen Jadwiga Clinical District Hospital No. 2 in Rzeszow, Poland. The inclusion criteria were age above 18 years, T2DM, and eGFR ≥60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. The exclusion criteria were anemia, overt proteinuria or urinary albumin/creatinine ratio (uACR) > 300 mg/g, hematologic malignancies, systemic connective tissue diseases, allergies, infections, uncontrolled hypertension, and treatment with potentially nephrotoxic medications. Patients gave written informed consent for the study. The protocol received permission from the Bioethics Committee of the Regional Medical Chamber in Rzeszow, Poland (approval number 70/2014/B issued on 19 September 2014).

A cross-sectional analysis was conducted using data obtained at the first visit of patients. A prospective, observational study was conducted in patients with available follow-up data. At the beginning of the study patients underwent a careful clinical examination, including the assessment of body mass index (BMI) and blood pressure, as well as laboratory tests. Cardiovascular complications of T2DM were diagnosed in patients with ischemic heart disease, heart failure, systemic atherosclerosis, or ischemic stroke that occurred after the diagnosis of T2DM. In accordance with current clinical regulations [19], nephroprotective treatment was initiated, hypertension treatment was modified taking into account documented, outpatient blood pressure readings, diabetes treatment was adjusted taking into account outpatient measurements of glycemic status and the measurements of glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), fluid and electrolyte balance was regulated, and hypolipemizing treatment was initiated or modified in order to control the lipid profile and the liver function parameters. Twelve months after the initiation of the study a subsequent clinical assessment of patients and laboratory tests were conducted.

Laboratory tests included fasting serum glucose, HbA<sub>1c</sub>, complete blood count, triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein- (LDL-) and high-density lipoprotein- (HDL-) cholesterol, and serum creatinine. eGFR was calculated on the basis of CKD-EPI equation [20]. The urine tests included examination of the sediment, concentrations of uNGAL, albumin, and creatinine in first morning urine sample. uNGAL was measured using CMIA (chemiluminescent microparticle immunoassay), on the immunochemistry platform ARCHITECT® (ARCHITECT Analyzer, Abbott Diagnostics, Abbott Park, USA). uNCR and uACR were calculated. The laboratory tests were performed at the Department of Laboratory Diagnostics at St. Queen Jadwiga Clinical District Hospital No. 2 in Rzeszow (Poland) at the day of blood collection.

**2.1. Statistical Analysis.** Numbers of patients (percentages of the study group) were reported for categories. Mean ± standard deviation or median (upper-lower quartile) was reported for quantitative variables (depending on distribution as evaluated with Shapiro-Wilk's test). Chi-squared test was used to analyze contingency tables. The parametric tests

TABLE 1: Baseline characteristics of the studied group of 55 T2DM patients with respect to cardiovascular complications of diabetes.

	Patients with cardiovascular complications (N = 19)	Patients without cardiovascular complications (N = 36)	P
Age, years	70 ± 11	59 ± 15	0.022
Female sex	10 (53)	19 (53)	1.0 NS
Ischemic heart disease, N (%)	17 (89)	—	—
Heart failure, N (%)	6 (32)	—	—
Systemic atherosclerosis, N (%)	5 (26)	—	—
T2DM duration, years	7 (4–10)	5 (1–10)	0.1 NS
Hypertension, N (%)	16 (84)	26 (72)	0.3 NS
Dyslipidemia, N (%)	18 (95)	33 (92)	0.7 NS
BMI, kg/m <sup>2</sup>	32.6 ± 7.6	30.8 ± 5.2	0.5 NS
HbA <sub>1c</sub> , %	6.2 (6.1–6.6)	7.5 (6.2–9.4)	0.2 NS
WBC, 10 <sup>3</sup> /μL	8.0 (5.3–9.7)	7.1 (5.9–8.4)	0.8 NS
Serum creatinine, μmol/L	64.5 (60.1–82.2)	65.8 (58.8–76.9)	0.6 NS
eGFR, mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	87 (71–94)	95 (81–99)	0.07 NS
Albuminuria, mg/L	12.3 (7.2–41.2)	9.5 (6.3–13.4)	0.048
uACR, mg/g	16.0 (7.5–53.6)	7.8 (3.4–13.2)	0.005
uNGAL, μg/L	22.3 (10.4–56.9)	18.8 (8.8–42.6)	0.7 NS
uNCR, μg/g	29.1 (13.4–58.8)	16.2 (9.5–38.8)	0.038

T2DM, type 2 diabetes mellitus; N, number of patients; BMI, body mass index; HbA<sub>1c</sub>, hemoglobin A<sub>1c</sub>; WBC, white blood cells; eGFR, estimated glomerular filtration rate; uNGAL, urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin; uNCR, urinary NGAL/creatinine ratio; uACR, urinary albumin/creatinine ratio; NS, nonsignificant result.

were used for normally distributed data, and nonparametric tests were used for nonnormally distributed data. In detail, the results obtained at the beginning of the study and after 12 months were compared using paired *t*-test or Wilcoxon test. The differences between groups were tested with unpaired *t*-test or Mann–Whitney test. Correlations were assessed using Pearson's or Spearman's correlation coefficients. In particular, the correlations between changes in the markers of kidney function were evaluated; the change in the value of a given marker was defined as the difference between the control value (value after 12 months of treatment) and the initial value (at the beginning of the study). Multiple logistic regression was calculated to study the association between cardiovascular complications and uACR and uNCR values, with adjustment for classical cardiovascular risk factors. Results were considered statistically significant at *p* < 0.05. Statistica 12 (StatSoft, Tulsa, USA) software was used for computations.

### 3. Results

Initially, 55 patients were qualified for the study. Nineteen of them were diagnosed with cardiovascular complications of T2DM. Patients with cardiovascular complications were characterized with older age, higher albuminuria and uACR values, and higher uNCR values (Table 1). Median uNCR value in the group of 55 T2DM patients was 21.3 μg/g. In multiple logistic regression, both uACR above 30 mg/g and uNCR the median were associated with cardiovascular complications independently of classical cardiovascular risk factors and diabetes duration (Table 2).

The follow-up data after 12 months from initiation of nephroprotective treatment were available for 30 patients. The prospective study group included 17 women (56%) and 13 men (44%), aged 64 ± 13 years. The median duration of T2DM at the beginning of the study was 9 (2–11) years. At the beginning of the study most patients were diagnosed with comorbidities: hypertension in 23 (77%), ischemic heart disease in 17 patients (31%), including one with the history of non-ST elevation myocardial infarction, systemic atherosclerosis in 5 (9%), and heart failure in 6 (11%) patients. Additionally, one patient had history of transient ischemic attack. No new cardiovascular complications were diagnosed during the follow-up. Most patients with hypertension received medications affecting the RAAS (angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers). These medications were used by 21 patients (70%) at the beginning of the study. Only in 2 patients with hypertension, because intolerance was not treated by the RAAS inhibitors, one of these patients was repeatedly prone to develop hyperkalemia, whereas the other developed hypotension when RAAS inhibitors were added to alpha-blocker used because of urological disorder. During the study, 28 patients (93%) were treated with RAAS inhibitors. Twelve patients (40%) were treated with statins.

The characteristics of the study group at the beginning of the study and after 12 months are presented in Table 3. At the beginning of the study 26 patients (87%) had a BMI ≥25 kg/m<sup>2</sup>, and the percentage remained the same after 12 months. During the study, BMI decreased in 16 patients (53%), increased in 9 (30%), and did not change in the remaining 5 patients (17%). Mean HbA<sub>1c</sub> decreased after

TABLE 2: Multiple logistic regression model showing the association between selected variables and cardiovascular complications among 55 T2DM patients evaluated at the beginning of the study.

Independent variables	Odds ratio (95% confidence interval)	<i>p</i>
Age, years	1.11 (0.99–1.25)	0.07 NS
Female sex	0.44 (0.05–3.80)	0.4 NS
T2DM duration, years	1.03 (0.84–1.26)	0.8 NS
BMI, kg/m <sup>2</sup>	1.22 (1.00–1.48)	0.041
Hypertension	5.21 (0.15–185)	0.3 NS
Dyslipidemia	0.16 (0.02–1.68)	0.1 NS
uACR > 30 mg/g	25.20 (1.01–639)	0.042
uNCR > 21.3 µg/g	14.99 (1.01–247)	0.048
Whole model		chi <sup>2</sup> = 19.8; <i>p</i> = 0.011

For abbreviations, see Table 1.

TABLE 3: Characteristics of 30 T2DM patients with available follow-up data at the beginning of the study (baseline results) and after 12-month follow-up (control results).

	Baseline results	Control results	<i>p</i>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	30.9 ± 5.5	31.4 ± 5.7	0.6 NS
HbA <sub>1c</sub> , %	7.98 ± 1.99	6.31 ± 0.93	0.037
Hemoglobin, g/dL	14.2 ± 1.4	13.9 ± 1.4	0.019
WBC, 10 <sup>3</sup> /µL	7.59 ± 2.39	7.34 ± 2.67	0.5 NS
Total cholesterol, mmol/L	5.38 (4.11–5.95)	4.78 (4.01–5.86)	0.3 NS
LDL-cholesterol, mmol/L	3.10 (2.07–3.75)	2.62 (1.98–3.94)	0.3 NS
HDL-cholesterol, mmol/L	1.32 (1.01–1.53)	1.36 (1.03–1.49)	0.1 NS
Triglycerides, mmol/L	1.57 (1.13–1.89)	1.53 (1.16–2.03)	0.5 NS
Serum creatinine, µmol/L	68.1 (60.1–76.9)	69.0 (61.9–77.8)	0.035
eGFR, mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	94.4 (79.7–98.3)	87.0 (74.6–99.0)	0.023
Albuminuria, mg/L	8.53 (6.59–13.53)	5.55 (2.14–19.75)	0.2 NS
uACR, mg/g	7.49 (3.39–13.38)	4.69 (2.86–43.41)	0.1 NS
uNGAL, µg/L	18.00 (9.00–32.20)	9.35 (2.50–19.30)	0.018
uNCR, µg/g	16.18 (10.00–33.72)	8.82 (3.09–26.83)	0.037
Leukocyturia, n/(%)	3 (10)	5 (17)	0.4 NS

LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; see Table 1.

12 months of treatment (Table 1), and in 19 patients (63%) good glycemic control was achieved (HbA<sub>1c</sub> < 6.5%). The treatment had no influence on the concentrations of total cholesterol, HDL- and LDL-cholesterol, or triglycerides (Table 3).

After 12 months, serum creatinine increased in 17 patients (57%) along with a decrease in eGFR (by 7 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> on average and 16 maximum). In 4 patients (13%) eGFR did not change, whereas in 9 (30%) it increased (by 4 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> on average and 10 maximum). Overall, average creatinine concentrations slightly increased, and average eGFR values in the whole study group decreased (Table 3). Simultaneously, average concentrations of uNGAL and urinary albumin decreased; however, in the case of albuminuria and uACR the difference was not statistically significant (Table 3). After a year of treatment, uNGAL concentrations increased in 10 patients (33%), but in 20

patients (67%) there was a considerable decrease in uNGAL (Figure 1). In turn, uNCR increased in 9 patients (30%) and decreased in 21 (70%). Albuminuria increased in 12 (40%) and uACR increased in 11 (73%), while it decreased in the remaining patients.

Patients whose eGFR values decreased during the study had higher initial concentrations of uNGAL and lower control concentrations of HDL-cholesterol and of triglycerides than patients whose eGFR values did not change or increased (Figures 2(a)–2(c)). The change in eGFR (defined as the difference between eGFR values at the end of the study and eGFR values at the beginning) was positively correlated with control concentrations of total cholesterol ( $R = 0.43$ ;  $p = 0.022$ ) and the initial and control concentrations of HDL-cholesterol ( $R = 0.39$ ;  $p = 0.042$  and  $R = 0.48$ ;  $p = 0.010$ , resp.). The change in eGFR was negatively correlated with the initial values of uNCR

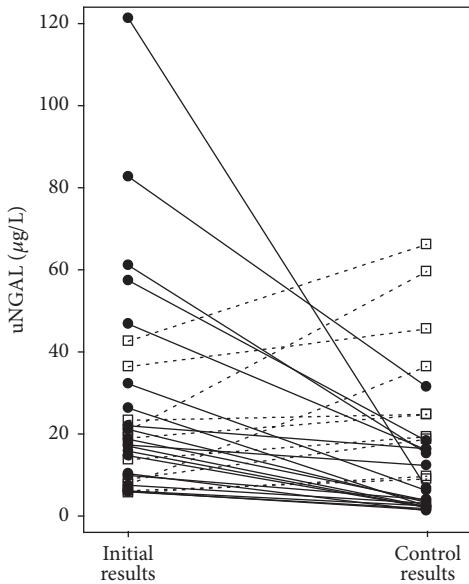


FIGURE 1: Urinary NGAL concentrations at the beginning of the study (initial results) and after 1 year of nephroprotective treatment (control results) among 30 DKD patients with available follow-up data. Closed circles and solid lines represent patients with decreasing uNGAL; open squares and dashed lines represent patients with increasing uNGAL. For abbreviations, see Table 1.

( $R = -0.38$ ;  $p = 0.036$ ) and the control concentration of uNGAL ( $R = -0.51$ ;  $p = 0.004$ ). The differences between the concentrations of uNGAL after 12 months and the initial concentrations correlated with, analogically assessed, changes in the concentrations of urinary albumin ( $R = 0.42$ ;  $p = 0.026$ ). A similar correlation was observed between the changes in uNCR and uACR ( $R = 0.48$ ;  $p = 0.011$ ). In most patients, a decrease in the values of both markers was observed during the study (Figure 3). In comparison with patients whose uACR values decreased, patients whose uACR values increased during 12 months had higher control values of HbA<sub>1c</sub> and higher leukocyte count (Figures 2(d) and 2(e)). The increase in uNGAL concentrations was associated with higher control concentrations of HbA<sub>1c</sub> (Figure 2(f)). Additionally, diabetes duration correlated positively with the changes in albuminuria ( $R = 0.40$ ;  $p = 0.033$ ) and uNCR ( $R = 0.46$ ;  $p = 0.010$ ).

The increase in uNCR was significantly more frequent ( $p = 0.048$ ) in hypertensive patients (9 out of 23 patients, 45%) than in patients with no hypertension (0 out of 7 patients). No correlations were observed between the increase or decrease in the values of kidney function markers and the presence of other comorbidities or medications applied. Furthermore, no correlations were observed between the changes in the values of kidney function markers and the age or gender of patients.

#### 4. Discussion

DKD remains one of the most serious complications of diabetes. Its late recognition and inadequate treatment may

lead to end-stage renal disease and the need for renal replacement therapy. However, although DKD is progressive and irreversible, there are studies indicating that early recognition of the disease and initiation of nephroprotective treatment may slow down its progression.

In T2DM patients, kidney function must be evaluated in a comprehensive manner. The evaluation should take into account not only GFR and albuminuria indicating the possible damage to the filtration membrane, but also the function of renal tubules. To assess the function of renal tubules, we analyzed the changes in uNGAL and uNCR measured in a first morning urine sample during a 12-month observation of patients suffering from T2DM and CKD stages G1 and G2, with accompanying normal or moderately increased albuminuria (A1 or A2), according to KDIGO criteria [20].

Patients recruited for our study had medical conditions and symptoms typical for the T2DM related metabolic syndrome and insulin resistance. These were excess weight or obesity (more than 78% of patients), hypertension (more than 77% of patients), or dyslipidemia requiring drug treatment (40% of patients). Taking into account cardiovascular disease observed in the ARETAEUS1 study, a study examining the clinical profile of the Polish population with T2DM of short duration, the patient group in our study was a representative sample [21].

According to the latest ADA 2016 and ESC 2016 guidelines, T2DM patients should change their dietary habits, maintain regular physical activity, and reduce their body weight [19]. Most patients in our study group were able to lose weight due to pharmacological treatment, as well as changes in diet and lifestyle.

According to the SHARP study, in order to reduce the risk of CVD in CKD patients, statins should be used [22]. Moreover, statins play a significant role in nephroprotective treatments [23]. In our study, 40% of patients were treated with statins. In accordance with ESC 2016 guidelines, none of patients was treated with fibrates, even though hypertriglyceridemia is a most pronounced lipid disorder in T2DM patients [24].

From the clinical point of view, it is important to observe that in most patients glycemic control, measured with HbA<sub>1c</sub>, improved after 12 months. This, in turn, had probably a direct influence on the reduction of albuminuria and the uACR values. Albuminuria is a recognized risk factor both for the progression of DKD and for cardiovascular disease [3]. Consequently, for nephrologists, reduction of albuminuria is crucial in the treatment of T2DM [19]. However, it has to be remembered that increased albuminuria (30–300 mg/g) is the first indicator of DKD only in a part of T2DM patients. In about 30% of DKD patients, progressive reduction in GFR is not accompanied by increased excretion of urinary albumin [25].

Since the assessment of kidney function based on eGFR and albuminuria is far from being satisfactory, and it allows only monitoring the function of the glomerular filtration membrane, we have made an attempt to assess the kidney function in T2DM patients with respect to possible damage to renal interstitium, by measuring uNGAL. uNGAL excretion

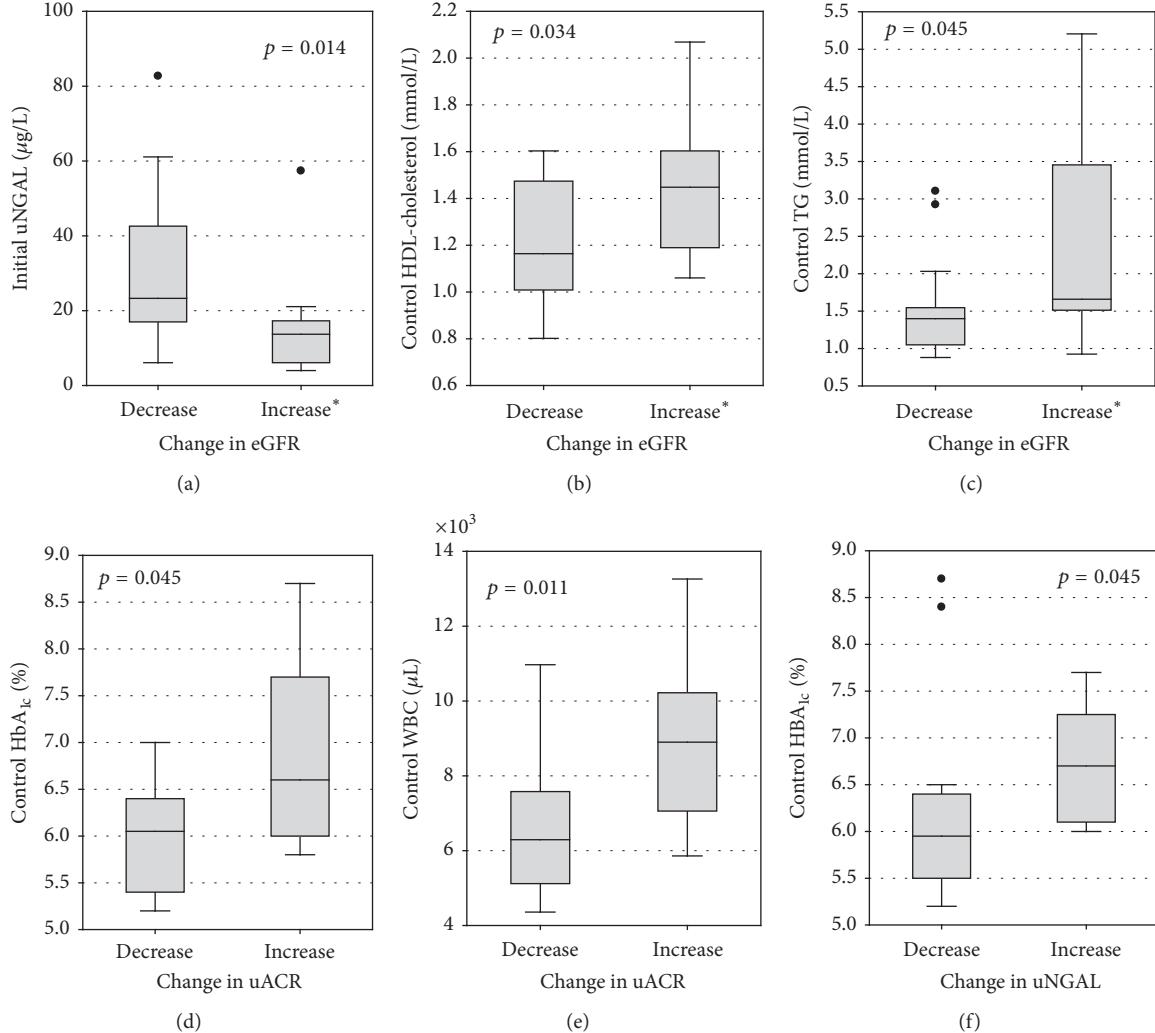


FIGURE 2: Statistically significant differences in laboratory test results between patients with different direction of change in the studied markers of kidney function. The change in the marker of kidney function was defined as the difference between the control value (after 12 months of treatment) and the initial value (at the beginning of the study). \* Increase or no change in eGFR. TG, triglycerides; see Tables 1 and 3.

increases significantly in the epithelial cells of the ascending limb of the loop of Henle in renal tubules in a response to ischemia or toxins [26]. It is assumed that NGAL may play a significant role in pathophysiology of kidney adaptation to the destructive influence of diabetic environment on renal tubules [14].

In this study, following the implemented treatment, a statistically significant decrease in uNGAL and uNCR was obtained after 12 months. The observed tendency for decreasing uNGAL and uNCR values may be a confirmation of the positive influence of multifactorial treatment of T2DM patients, aimed at inhibiting the progression of renal tubules damage. During a 3.5-year observation of T2DM patients, Nielsen et al. [27] observed a positive correlation of uNCR with HbA<sub>1c</sub>. Similarly, we observed a decrease in HbA<sub>1c</sub> during a 12-month study, accompanied by a decrease in tubular proteinuria (uNCR values).

The observed significant decrease in eGFR confirms the observation that in people over the age of 30, the decline in GFR values is a physiological process (the annual rate of decrease in GFR is 0.75–1 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) [28, 29], further accelerated to 2.3–5.4 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> in DKD [30]. In our study, the decrease in eGFR values may also be a consequence of blocking the RAAS in most patients. Such treatment aims at lowering the glomerular filtration pressure, which in the initial phase of DKD leads also to a clinically insignificant decrease in eGFR. However, when applied for a longer time, such treatment has nephroprotective and cardioprotective effects, independently of blood pressure values [3]. According to ADA standards, all patients with uACR greater than 30 mg/g, irrespective of eGFR values, should be treated with angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI) and angiotensin II receptor blockers. In such patients, it is necessary to monitor the serum creatinine and kalemia.

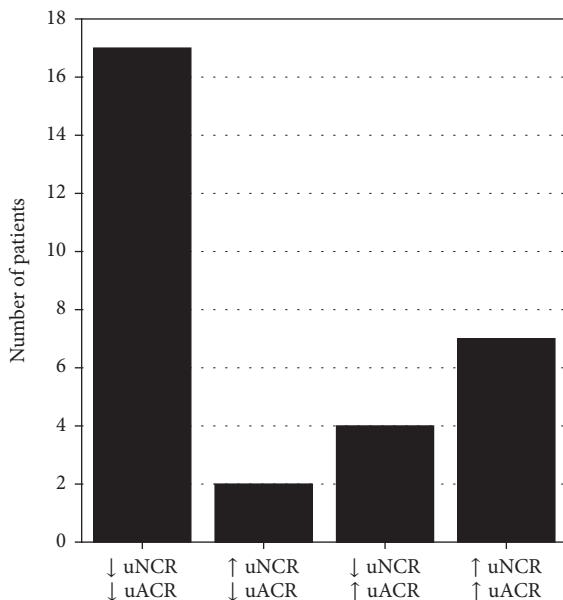


FIGURE 3: Numbers of patients in whom either a decrease or an increase in the values of uNCR and uACR was observed after 12 months of treatment in comparison with initial values. ↓: decrease in the value of a given marker as assessed after 12 months of the study; ↑: increase in the value of a given marker as assessed after 12 months of the study; For abbreviations, see Table 1.

This treatment is not recommended in primary prevention of DKD with normotension, normal range of albuminuria, and normal eGFR [19]. Treatment with ACEI leads to the reduction in hemoglobin concentration [31, 32]. In this study the decrease in hemoglobin concentrations (statistically significant, but clinically insignificant), confirms, together with the hypotensive effect, the effectiveness of ACEI.

Other authors, in 12-month follow-up of DKD patients, observed the increase in uNGAL [33], as well as inverse correlations between uNGAL, uACR, and GFR in T2DM patients [15–17], which is contrary to our results. The discrepancies may result from different patient care and from racial differences in populations studied (all patients in our study were of Caucasian race).

The authors of ESC 2016 guidelines stress the potential benefits of introducing novel urinary biomarkers in selected patient populations, as these may contribute to improved assessment of cardiovascular risk [3]. Clinical trials aimed at finding the optimal biomarker pass through successive phases [34]. The authors of this study have observed that, at the time of the first visit, patients with cardiovascular disease had higher values of uACR and uNCR than patients without cardiovascular disease. Both uACR and uNCR were independently associated with cardiovascular complications, irrespective of classical cardiovascular risk factors. No new incidents of cardiovascular disease were diagnosed in the study group during the 12-month follow-up. During this time significant decrease in both uNGAL and uNCR and no increase in albuminuria were observed. Our results indicate that renal complications of T2DM, both those involving

glomeruli and tubules, are significantly associated with cardiovascular complications of diabetes. Thus, the measurement of uNCR may be helpful in the clinical prediction of CVD in T2DM patients.

The major limitation of our study is the small number of patients enrolled. Therefore, we cannot draw any definitive conclusions. However, the results seem promising and should be validated in larger studies.

## 5. Conclusions

On the basis of a 12-month observation of early-phase DKD patients it can be concluded that multifactorial nephroprotective treatment, focused primarily on the improvement of glycemic control, has a positive effect on the function of renal tubules as reflected by the diminishing concentrations of uNGAL and uNCR. Additionally, uNCR may be considered as independent predictor of the increased risk of CVD in the population studied.

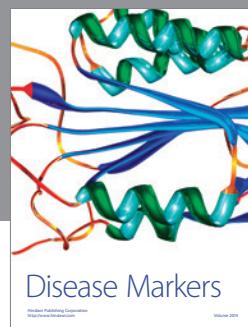
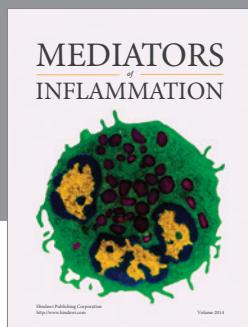
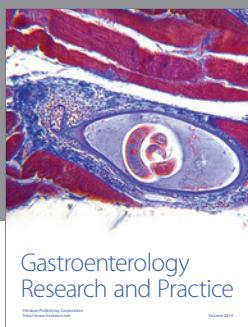
## Competing Interests

The authors declare no conflict of interests.

## References

- [1] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, 7th edition, 2015, <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
- [2] World Health Organization, Ed., *Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2009.
- [3] M. F. Piepoli, A. W. Hoes, S. Agewall et al., “European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: the Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts): developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR),” *European Journal of Preventive Cardiology*, vol. 23, pp. 1–96, 2016.
- [4] K. R. Tuttle, G. L. Bakris, R. W. Bilous et al., “Diabetic kidney disease: a report from an ADA consensus conference,” *Diabetes Care*, vol. 37, no. 10, pp. 2864–2883, 2014.
- [5] S. M. Bagshaw and R. T. N. Gibney, “Conventional markers of kidney function,” *Critical Care Medicine*, vol. 36, no. 4, pp. S152–S158, 2008.
- [6] A. K. Mottl, K.-S. Kwon, M. Mauer, E. J. Mayer-Davis, S. L. Hogan, and A. V. Kshirsagar, “Normoalbuminuric diabetic kidney disease in the U.S. population,” *Journal of Diabetes and Its Complications*, vol. 27, no. 2, pp. 123–127, 2013.
- [7] A. Lewandowicz, M. Bakun, R. Kohutnicki et al., “Changes in urine proteome accompanying diabetic nephropathy progression,” *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, vol. 125, no. 1–2, pp. 27–38, 2015.
- [8] T. Miyata, “Novel mechanisms and therapeutic options in diabetic nephropathy,” *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, vol. 119, pp. 261–264, 2009.
- [9] Z. Marchewka, “Low molecular weight biomarkers in the nephrotoxicity,” *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, vol. 15, no. 6, pp. 1129–1138, 2006.

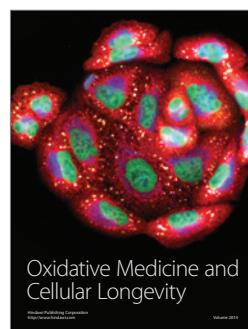
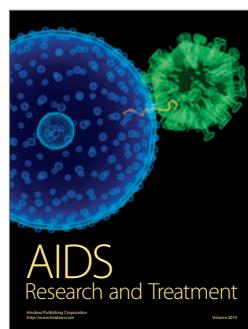
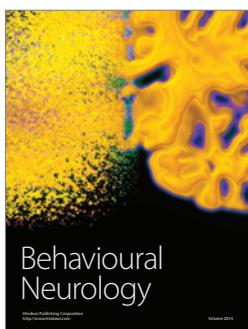
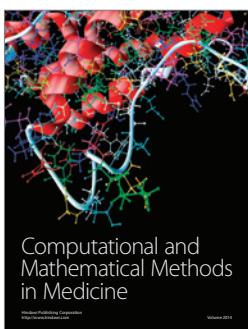
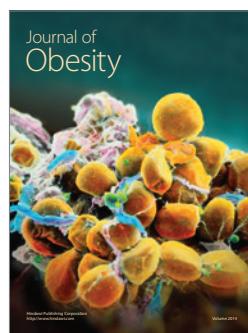
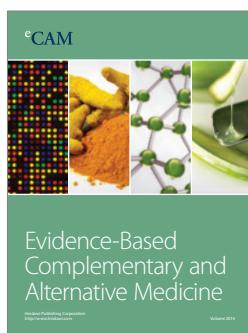
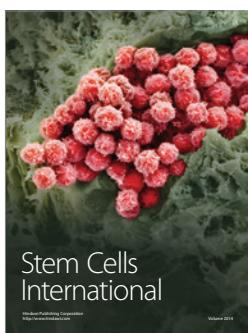
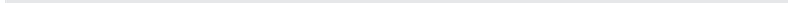
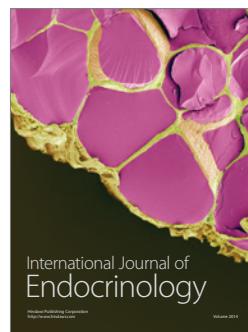
- [10] S. M. Bagshaw, R. Bellomo, P. Devarajan et al., "Review article: acute kidney injury in critical illness," *Canadian Journal of Anesthesia*, vol. 57, no. 11, pp. 985–998, 2010.
- [11] P. Devarajan, "Biomarkers for the early detection of acute kidney injury," *Current Opinion in Pediatrics*, vol. 23, no. 2, pp. 194–200, 2011.
- [12] K. D. Liu, W. Yang, A. H. Anderson et al., "Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels do not improve risk prediction of progressive chronic kidney disease," *Kidney International*, vol. 83, no. 5, pp. 909–914, 2013.
- [13] K. Mori, H. T. Lee, D. Rapoport et al., "Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 3, pp. 610–621, 2005.
- [14] J. Helmersson-Karlqvist, J. Ärnlöv, and A. Larsson, "Day-to-day variation of urinary NGAL and rational for creatinine correction," *Clinical Biochemistry*, vol. 46, no. 1-2, pp. 70–72, 2013.
- [15] D. Bolignano, A. Lacquaniti, G. Coppolino et al., "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 4, no. 2, pp. 337–344, 2009.
- [16] J. Wu, Y. Ding, C. Zhu et al., "Urinary TNF- $\alpha$  and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 6, no. 6, pp. 1482–1488, 2013.
- [17] K.-M. Chou, C.-C. Lee, C.-H. Chen, and C.-Y. Sun, "Clinical value of NGAL, L-FABP and albuminuria in predicting GFR decline in type 2 diabetes mellitus patients," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e54863, 2013.
- [18] A. Gala-Bladzinska, A. Zylka, K. Rybak, P. Dumnicka, M. Kuzniewski, and B. Kusnierz-Cabala, "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," *Diagnostyka Laboratoryjna*, vol. 51, no. 2, pp. 97–104, 2015.
- [19] R. W. Grant and M. S. Kirkman, "Trends in the evidence level for the american diabetes association's "standards of medical care in diabetes" from 2005 to 2014," *Diabetes Care*, vol. 38, no. 1, pp. 6–8, 2015.
- [20] National Kidney Foundation, "KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 update," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 60, pp. 850–886, 2012.
- [21] M. M. Bała, E. Płaczkiewicz-Jankowska, R. Topór-Mądry et al., "Characteristics of patients with type 2 diabetes of short duration in Poland: Rationale, Design And Preliminary Results Of The ARETAEUS1 study," *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, vol. 119, no. 9, pp. 533–540, 2009.
- [22] SHARP Collaborative Group, "Study of Heart and Renal Protection (SHARP): randomized trial to assess the effects of lowering low-density lipoprotein cholesterol among 9,438 patients with chronic kidney disease," *American Heart Journal*, vol. 160, no. 5, pp. 785.e10–794.e10, 2010.
- [23] C. J. Rodrigues, "HMG CoA reductase inhibitors (statins) for people with chronic kidney disease not requiring dialysis," *Sao Paulo Medical Journal*, vol. 133, pp. 541–542, 2015.
- [24] A. B. Goldfine, S. Kaul, and W. R. Hiatt, "Fibrates in the treatment of dyslipidemias—time for a reassessment," *New England Journal of Medicine*, vol. 365, no. 6, pp. 481–484, 2011.
- [25] S. S. Kim, S. H. Song, I. J. Kim et al., "Nonalbuminuric proteinuria as a biomarker for tubular damage in early development of nephropathy with type 2 diabetic patients," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 30, no. 8, pp. 736–741, 2014.
- [26] A. Gala-Bladzinska and M. Kuzniewski, "Performance neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical settings," *Przegld Lekarski*, vol. 70, no. 6, pp. 400–403, 2013.
- [27] S. E. Nielsen, H. Reinhard, D. Zdunek et al., "Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 97, no. 1, pp. 71–76, 2012.
- [28] R. D. Lindeman, J. Tobin, and N. W. Shock, "Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 33, no. 4, pp. 278–285, 1985.
- [29] D. R. Puvel, "The aging kidney," *Kidney International*, vol. 54, no. 6, pp. 2247–2265, 1998.
- [30] P. Gæde, L. Tarnow, P. Vedel, H.-H. Parving, and O. Pedersen, "Remission to normoalbuminuria during multifactorial treatment preserves kidney function in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 19, no. 11, pp. 2784–2788, 2004.
- [31] M. E. Statsenko, M. V. Derevyanchenko, and O. R. Pastuchova, "Effect of combination antihypertensive therapy on circadian blood pressure and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus," *Kardiologiya*, vol. 54, no. 11, pp. 20–24, 2014.
- [32] R. Fernández González, R. García Robles, J. C. Rodríguez Pérez, C. Gómez Pajuelo, and E. Moreno Carretero, "The effect of trandolapril, in monotherapy and associated with verapamil, on arterial pressure, albuminuria, and metabolic control in hypertensive patients with type 2 diabetes and albuminuria," *Nefrologia*, vol. 21, no. 5, pp. 456–463, 2001.
- [33] Y.-H. Yang, X.-J. He, S.-R. Chen, L. Wang, E.-M. Li, and L.-Y. Xu, "Changes of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in type-2 diabetic patients with nephropathy: one year observational follow-up study," *Endocrine*, vol. 36, no. 1, pp. 45–51, 2009.
- [34] I. Tzoulaki, K. C. Siontis, E. Evangelou, and J. P. A. Ioannidis, "Bias in associations of emerging biomarkers with cardiovascular disease," *JAMA Internal Medicine*, vol. 173, no. 8, pp. 664–671, 2013.



The Hindawi logo consists of two interlocking circles, one blue and one green, forming a stylized infinity or double helix symbol.

**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



## **6. Artykuł nr 4**

*Żylka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Cera nowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.*: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediat Inflamm.* 2018; doi.org/10.1155/2018/7659243.

## Research Article

# Markers of Glomerular and Tubular Damage in the Early Stage of Kidney Disease in Type 2 Diabetic Patients

Agnieszka Żyłka,<sup>1</sup> Paulina Dumnicka<sup>2</sup>, Beata Kuśnierz-Cabala<sup>3</sup>,  
Agnieszka Gala-Błędzińska,<sup>1,4</sup> Piotr Ceranowicz<sup>5</sup>, Jakub Kucharz,<sup>6</sup>  
Anna Ząbek-Adamska,<sup>7</sup> Barbara Maziarz,<sup>3,7</sup> Ryszard Drożdż,<sup>2</sup> and Marek Kuźniewski<sup>8</sup>

<sup>1</sup>St. Queen Jadwiga Clinical District Hospital No. 2, 35-301 Rzeszów, Poland

<sup>2</sup>Department of Medical Diagnostics, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Kraków, Poland

<sup>3</sup>Department of Diagnostics, Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 31-501 Kraków, Poland

<sup>4</sup>Faculty of Medicine, University of Rzeszów, 35-310 Rzeszów, Poland

<sup>5</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 31-531 Kraków, Poland

<sup>6</sup>Department of Uro-Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, 02-781 Warsaw, Poland

<sup>7</sup>Diagnostic Department, University Hospital, 31-501 Kraków, Poland

<sup>8</sup>Chair and Department of Nephrology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 31-501 Kraków, Poland

Correspondence should be addressed to Beata Kuśnierz-Cabala; mbkusnie@cyf-kr.edu.pl

Received 13 February 2018; Revised 25 June 2018; Accepted 10 July 2018; Published 9 August 2018

Academic Editor: Sandra Rayego-Mateos

Copyright © 2018 Agnieszka Żyłka et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Diabetic kidney disease develops in half of genetically predisposed patients with type 2 diabetes (T2DM). Early diagnosis of kidney damage and nephroprotective treatment are the ways of preventing the disease progression. Our aim was to evaluate selected laboratory markers of glomerular and tubular damage in T2DM patients with early stages of chronic kidney disease (G1/G2, A1/A2) for their associations with A2 albuminuria and early decline in the estimated glomerular filtration rate (eGFR). Among 80 T2DM patients with median eGFR of 92.4 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> and median urinary albumin to creatinine ratio (uACR) of 4.69 mg/g, 19 had uACR > 30 mg/g (A2). Higher serum cystatin C, serum and urine neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), urine kidney injury molecule 1 (KIM-1), detectable urine transferrin and IgG, and lower serum uromodulin significantly predicted A2 albuminuria, urine KIM-1/creatinine ratio, and IgG being the best predictors. Albuminuria, urine NGAL/creatinine, and IgG correlated with diabetes duration. Albuminuria, urine NGAL, transferrin, IgG, and uromodulin correlated with diabetes control. In a subgroup of 29 patients, retrospective data were available on changes in eGFR and uACR over one year. Decline in eGFR was observed in 17 patients and increase in uACR in 10 patients. Serum and urine NGAL correlated with eGFR changes. Higher urine NGAL, KIM-1/creatinine ratio, and detectable IgG were significantly associated with the increase in uACR. Widely available markers, serum cystatin C, urine IgG, transferrin, and NGAL, may help in early assessment of kidney disease in T2DM patients; however, large prospective studies are needed to confirm the conclusion.

## 1. Introduction

Diabetes is the most prevalent metabolic disease worldwide, and its complications are among the most important public health issues [1]. About 30–40% of diabetic patients, especially the genetically predisposed ones, develop diabetic kidney disease (DKD), which makes it the most frequent

cause of end-stage kidney disease and renal replacement therapy [2, 3].

Early diagnosis and early initiation of nephroprotective therapy have the potential to prevent the progression of DKD toward end-stage renal disease and to improve patients' prognosis. Based on the guidelines issued by Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) in 2007 [4], the

repeated assessment of urine albumin/creatinine ratio (uACR) in two to three samples of morning urine together with the estimation of glomerular filtration rate (eGFR) has been recognized as the best standard screening for DKD. However, currently, it is well known that kidney damage in course of type 2 diabetes mellitus (T2DM) may occur without increased albuminuria [5]. Moreover, decrease in eGFR is not an early indicator of diabetic renal damage. Therefore, in some patients, albuminuria and eGFR are not sensitive markers of early DKD. Diagnostic imaging produces nonspecific results in DKD patients, and the thick needle biopsy is very rarely used due to invasiveness and the lack of strict clinical indications in the early stage of DKD, usually characterized by very few symptoms. Thus, there is a need to seek new biomarkers of early renal damage in patients with T2DM.

Morphological changes observed in kidneys in the course of DKD affect almost all nephron structures: glycocalyx and glomerular endothelial cells, glomerular basement membrane, podocytes and slit membranes, mesangial matrix, renal interstitium, and renal tubules [6]. To properly qualify the potential markers of renal damage in T2DM, it is useful to classify them according to the renal structure affected by the pathological process [7]. On this basis, we distinguish markers of glomerular damage including transferrin, immunoglobulin G (IgG), ceruloplasmin, type IV collagen, laminin, glycosaminoglycans, lipocalin-type prostaglandin D synthase, fibronectin, podocalyxin, vascular endothelial growth factor, cystatin C (CysC), or nephrin and markers of tubular damage such as neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), alpha-1-microglobulin, kidney injury molecule-1 (KIM-1), N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, angiotensinogen, uromodulin, liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP), heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP), the products of advanced glycation, or inflammatory markers [8]. Some biomarkers, including albumin, are filtered in the glomeruli and then reabsorbed in the proximal tubule of the nephron; increased urine excretion of such markers may indicate damage of both glomerular and tubular structures [7].

The aim of the study was the assessment of selected laboratory markers of glomerular and tubular damage in serum and urine of T2DM patients without significant decrease in the glomerular filtration rate and without significantly increased albuminuria. We evaluated the studied biomarkers as the predictors of moderately increased albuminuria and evaluated their associations with early decline of kidney function in T2DM.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Study Group.** The cross-sectional study recruited consecutive patients with T2DM consulted at the ambulatory clinic of Nephrology Department of Clinical District Hospital No. 2 in Rzeszów, Poland, between October 2014 and November 2015. The study visit was a part of a standard care and was either arranged to assess kidney function in newly diagnosed T2DM patients or was a control visit of patients with single benign renal cysts or following treatment of

urinary tract infection. A subgroup of patients attended a control visit as a part of longitudinal observation of changes in eGFR and urine albumin/creatinine ratio (uACR) [9]. Inclusion criteria were T2DM diagnosis,  $eGFR > 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ , and  $uACR < 300 \text{ mg/g}$ . We excluded patients diagnosed with anemia, neoplasm, connective tissue disease, infection, allergy, treated with potentially nephrotoxic drugs, and with known renal disease other than DKD. Moreover, patients with poorly controlled hypertension, decompensated heart failure, urinary tract infection, after increased physical activity, and women during menstruation as well as pregnant women were excluded to avoid nonspecific albuminuria.

Patients were subjected to detailed medical examination. Patient's history was collected focusing on the presence of comorbidities, their duration, and treatment. Weight, height, and blood pressure were measured; body mass index (BMI) was calculated, and laboratory tests were ordered. According to 2012 KDOQI guidelines [10], kidney impairment was assessed based on uACR and eGFR estimated using 2009 Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula based on serum creatinine (CKD-EPI<sub>Cr</sub>). Moderately increased albuminuria (uACR between 30 and 300 mg/g or A2 albuminuria category) was considered the objective evidence of kidney disease, according to the definition of chronic kidney disease issued by Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) [11].

In a subgroup of patients, retrospective data were available on eGFR values and uACR changes over one-year observation. These patients were seen a year and 6 months before the study visit. During the previous visits, patients were instructed to maintain physical activity and diabetic diet. The doses of insulin or oral hypoglycemic drugs were adjusted to maintain good glycemic control. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors were used as antihypertensive drugs, and statins were used in treatment of dyslipidemia if not contraindicated [12]. We assumed the decrease in eGFR based on serum creatinine and the increase in urine albumin/creatinine ratio after one year of observation as the indicators of kidney function decline [13, 14].

All patients provided informed consent for the study. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the Regional Medical Chamber in Rzeszów, Poland (approval number 70/2017/B issued on 19th September 2014).

**2.2. Laboratory Tests.** First morning urine and fasting blood sample were collected for laboratory measurements at the day of the study visit. The laboratory tests included routine tests used for the assessment of the patients' health status, and a set of additional tests was performed for the purpose of this study.

The routine tests included fasting serum glucose, glycated hemoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>), complete blood count, lipid profile, serum C-reactive protein (CRP), and creatinine. GFR was estimated based on serum creatinine according to CKD-EPI<sub>Cr</sub> formula [8]. Urinalysis with urine sediment analysis was performed using the first morning urine sample to exclude urinary tract infection. First morning urine samples

were also tested for the concentration of NGAL, albumin, and creatinine, and then, uACR and urine NGAL/creatinine ratios (uNGAL/Cr) were calculated. The measurements of uNGAL were conducted using chemiluminescent microparticle immunoassay and Architect analyzer (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, USA). Urine albumin concentrations were measured using an immunoturbidimetric method, and creatinine concentration was assessed using an enzymatic method on Olympus/Beckman Coulter Chemistry Analyzer AU680 (Beckman Coulter, Brea, USA). Peripheral blood counts were performed using a hematology analyzer ADVIA 2120i (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Urinalysis was performed using LabUMat-UriSed 2 analyzer. The routine tests and uNGAL measurements were performed on the day of samples' collection in the Department of Diagnostics of St. Queen Jadwiga Clinical District Hospital, Rzeszów, Poland.

The remaining serum and urine were aliquoted and frozen in  $-80^{\circ}\text{C}$  until the complete set of samples was collected. The tests were performed in series to avoid the cycles of repeated freezing/defreezing. The preserved material was used to determine the concentrations of transferrin, IgG, KIM-1, and uromodulin (uUMOD) in urine and NGAL, CysC, and uromodulin (sUMOD) in serum. Transferrin, IgG, and CysC were measured using an immunonephelometric method on a Nephelometer II analyzer (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) at the Diagnostics Department, University Hospital, Kraków, Poland. The upper reference limits were, respectively, 2.17 mg/l for urine transferrin and 3.36 mg/l for urine IgG. The reference range for serum cystatin C was 0.59–1.04 mg/l. The concentrations of sUMOD, uUMOD, serum NGAL, and urine KIM-1 were determined using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays with a Human Uromodulin ELISA kit (BioVendor, Brno, Czech Republic), a Human Lipocalin-2/NGAL ELISA kit (BioVendor, Brno, Czech Republic), and Quantikine ELISA Human TIM-1/KIM-1/HAVCR Immunoassay (R&D Systems, McKinley Place, MN, USA), respectively. The readings were done with an automatic microplate reader Automatic Micro ELISA Reader ELX 808 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). The reference range for sUMOD determined by the manufacturer of the kit was 37.0–501.0 ng/ml (mean 241 ng/ml); the limit of detection was 0.12 ng/ml. The reference range for urine KIM-1 values determined by the manufacturer of the kit was 0.156–5.33 ng/ml, and mean detectable concentration was 0.009 ng/ml. The limit of detection of NGAL in serum was 0.02 ng/ml, and the reference values were  $63.5 \pm 33.4$  for men and  $64.9 \pm 46.5$  ng/ml for women. Uromodulin, serum NGAL, and KIM-1 measurements were performed in the Department of Diagnostics, Chair of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland.

**2.3. Statistical Analysis.** Data were presented as number of patients (percentage of the group) for categories, mean  $\pm$  standard deviation or median (lower-upper quartile) for quantitative variables with normal and nonnormal distributions (as checked using Shapiro-Wilk's test).

Spearman's rank correlation coefficient was used to study correlations. Differences between groups were tested with *t*-test and Mann-Whitney's test, according to distributions. Simple and multiple logistic regressions were used to assess predictors of G1/G2 A2 CKD. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) were reported as results of logistic regression. The variables that proved significant predictors in simple logistic regression were studied further using receiver operating characteristic (ROC) curves' analysis to assess the diagnostic accuracy. Cut-off values were chosen by maximizing the Youden index. The statistical tests were two-tailed, and the results were considered significant at  $p < 0.05$ . Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, USA) was used for computations.

### 3. Results

**3.1. Characteristics of Patients.** The study recruited 80 patients with T2DM with median eGFR (CKD-EPI<sub>Cr</sub>) of 92.4 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (79.7–101.0 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>) and median uACR of 4.69 mg/g (2.86–19.17 mg/g). The patients presented with typical comorbidities, including hypertension in (67) 84%, ischemic heart disease in 10 (12%), and heart failure in 6 (7%). In most patients, diabetes was well controlled: median HbA<sub>1c</sub> concentrations equaled 6.4% (5.9–7.9%). The treatment of diabetes included metformin in 74 patients (93%). Insulin therapy was necessary in 25 patients (31%).

Most patients ( $N = 61$ ; 77%) had normal to mildly increased albuminuria (uACR  $< 30$  mg/g). Moderately increased albuminuria (uACR between 30 and 300 mg/g) was observed in 19 patients (23%) (Table 1). On average, these patients were older and had longer known duration of diabetes, as well as higher HbA<sub>1c</sub> (Table 1). Ischemic heart disease was more commonly associated with moderately increased albuminuria; however, no significant differences regarding other comorbidities nor treatment modalities were observed between patients with normal and moderately increased albuminuria (Table 1). Moreover, white blood cell counts and C-reactive protein concentrations were higher among patients with uACR between 30 and 300 mg/g (Table 1).

**3.2. The Associations of Studied Markers with Moderately Increased Albuminuria.** Serum cystatin C, serum NGAL, urine NGAL and NGAL/creatinine ratios, urine KIM-1 and KIM-1/creatinine ratio, urine transferrin, and urine IgG were significantly higher among patients with moderately increased albuminuria while serum uromodulin was significantly lower in this group of patients (Table 1). High serum cystatin C, serum NGAL, urine NGAL and NGAL/creatinine ratio, urine KIM-1 and KIM-1/creatinine ratio, detectable urine transferrin, and urine IgG as well as low serum uromodulin were also significant predictors of moderately increased albuminuria in simple logistic regression (Table 2). Most of these predictors (except for serum concentrations of cystatin C, NGAL, and uromodulin) were independent of age, diabetes duration, the presence of hypertension, heart failure, and the treatment with

TABLE 1: Clinical characteristics and the results of laboratory tests of T2DM patients with eGFR > 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> according to albuminuria categories.

Characteristic	Normal to mildly increased albuminuria: uACR < 30 mg/g (N = 61)	Moderately increased albuminuria: uACR 30–300 mg/g (N = 19)	p value
Age, years	59 ± 11	67 ± 12	0.007 <sup>#</sup>
Male sex, N (%)	32 (52)	6 (32)	0.1
Known diabetes duration, years	5 (2–10)	10 (6–15)	0.009 <sup>#</sup>
Hypertension, N (%)	50 (82)	17 (89)	0.4
Ischemic heart disease, N (%)	5 (8)	5 (26)	0.037 <sup>#</sup>
Heart failure, N (%)	3 (5)	3 (16)	0.1
BMI, kg/m <sup>2</sup>	31.5 ± 5.0	31.9 ± 7.5	0.8
Insulin treatment, N (%)	17 (28)	8 (42)	0.2
Statin use, N (%)	27 (44)	13 (68)	0.07
ACEI/ARB use, N (%)	40 (66)	13 (68)	0.8
Hemoglobin, g/dl	14.0 ± 1.4	13.2 ± 1.7	0.045 <sup>#</sup>
White blood cell count, ×10 <sup>3</sup> /μl	7.20 (6.20–8.33)	8.51 (6.65–10.30)	0.039 <sup>#</sup>
Fasting glucose, mmol/l	6.95 ± 0.84	7.25 ± 0.70	0.2
HbA <sub>1c</sub> , %	6.30 (5.90–7.80)	7.35 (6.30–8.40)	0.049 <sup>#</sup>
Total cholesterol, mmol/l	4.68 (3.85–5.74)	4.84 (3.98–5.72)	0.8
HDL-cholesterol, mmol/l	1.19 (1.06–1.42)	1.22 (1.01–1.40)	0.7
LDL-cholesterol, mmol/l	2.66 (1.86–3.49)	2.49 (1.94–3.54)	0.8
Triglycerides, mmol/l	1.53 (1.15–2.03)	1.83 (1.40–2.80)	0.07
C-reactive protein, mg/l	2.80 (1.30–5.80)	6.90 (3.40–14.60)	0.008 <sup>#</sup>
Serum creatinine, μmol/l	68.1 (59.2–78.7)	64.5 (53.0–79.6)	0.6
eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ), ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	94 (81–101)	86 (72–97)	0.2
Serum cystatin C, mg/l	0.86 (0.78–1.01)	1.15 (0.93–1.37)	<0.001 <sup>#</sup>
eGFR (CKD-EPI <sub>CysC</sub> ), ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	93 (78–103)	71 (62–95)	0.002 <sup>#</sup>
Serum NGAL, μg/l	53.8 (43.3–70.4)	67.2 (61.0–103.1)	0.013 <sup>#</sup>
Urine NGAL, μg/l	10.3 (3.1–21.8)	24.7 (14.3–43.9)	0.008 <sup>#</sup>
Urine NGAL/creatinine, μg/g	9.02 (2.97–18.84)	35.1 (8.89–74.92)	0.012 <sup>#</sup>
Urine KIM-1, μg/l	0.73 (0.32–1.54)	1.26 (0.73–2.92)	0.022 <sup>#</sup>
Urine KIM-1/creatinine, μg/g	0.98 (0.30–1.31)	1.91 (1.20–3.29)	<0.001 <sup>#</sup>
Urine transferrin, mg/l	<2.17	<2.17 (<2.17–6.43)	<0.001 <sup>#</sup>
Detectable urine transferrin (≥2.17 mg/l), N (%)	1 (2)	9 (47)	<0.001 <sup>#</sup>
Urine IgG, mg/l	<3.36	5.88 (<3.36–12.60)	<0.001 <sup>#</sup>
Detectable urine IgG (≥3.36 mg/l), N (%)	4 (7)	14 (74)	<0.001 <sup>#</sup>
Serum uromodulin, μg/l	127 (95–173)	100 (58–138)	0.031 <sup>#</sup>
Urine uromodulin, mg/l	6.56 (2.19–14.38)	5.60 (2.09–13.41)	0.5
Urine uromodulin/creatinine, mg/g	7.62 (2.18–15.95)	9.19 (3.31–12.79)	0.8

<sup>#</sup>Statistically significant difference between the groups. Abbreviations: T2DM: type 2 diabetes mellitus; uACR: urine albumin to creatinine ratio; BMI: body mass index; ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB: angiotensin receptor blocker; HbA<sub>1c</sub>: glycated hemoglobin A1c; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; eGFR: estimated glomerular filtration rate; CKD-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; Cr: creatinine; CysC: cystatin C; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; KIM-1: kidney injury molecule-1; IgG: immunoglobulin G.

renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors (Table 2). In ROC curves' analysis, urine KIM-1/creatinine and urine IgG showed highest values of the area under the ROC curve, being the best markers to discriminate between patients with and without moderately increased albuminuria (Figure 1, Table 3). In case of most studied markers, the cut-off values selected to best discriminate between patients with normal to mildly increased and moderately increased albuminuria fell within the values observed in

healthy individuals. However, this was not the case for serum cystatin C, urine transferrin, and urine IgG, where the selected cut-off values were slightly higher than the upper reference limit established by our laboratory. Among 61 patients with uACR < 30 mg/g, 11 patients (18%) had serum cystatin C above the upper reference limit of 1.04 mg/l, 4 (7%) had urine IgG above the upper reference limit of 3.36 mg/l, and 1 (2%) had urine transferrin above the upper reference limit of 2.17 mg/l.

TABLE 2: Odds ratios for moderately increased albuminuria (uACR between 30 and 300 mg/g) among T2DM patients with eGFR > 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> in simple and multiple logistic regressions adjusted for age, diabetes duration, the presence of hypertension, heart failure, and the treatment with renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors.

Predictor variable	Simple analysis		Multiple analysis	
	Odds ratio (95% confidence interval)	p value	Odds ratio (95% confidence interval)	p value
Serum creatinine, per 1 µmol/l	0.99 (0.96–1.02)	0.6	0.98 (0.94–1.01)	0.2
Serum cystatin C, per 1 mg/l	33.09 (2.82–387.83)	0.005 <sup>#</sup>	14.98 (0.64–353.13)	0.09
Serum NGAL, per 1 µg/l	1.02 (1.00–1.04)	0.018 <sup>#</sup>	1.02 (1.00–1.04)	0.059
Urine NGAL, per 1 µg/l	1.04 (1.01–1.07)	0.016 <sup>#</sup>	1.04 (1.00–1.07)	0.035 <sup>#</sup>
Urine NGAL/creatinine, per 1 µg/g	1.02 (1.00–1.035)	0.018 <sup>#</sup>	1.02 (1.00–1.04)	0.035 <sup>#</sup>
Urine KIM-1, per 1 µg/l	1.64 (1.09–2.45)	0.020 <sup>#</sup>	1.87 (1.11–3.15)	0.016 <sup>#</sup>
Urine KIM-1/creatinine, per 1 µg/g	5.63 (2.16–14.68)	<0.001 <sup>#</sup>	7.12 (2.22–22.87)	<0.001 <sup>#</sup>
Detectable urine transferrin	54.00 (5.95–490.37)	<0.001 <sup>#</sup>	54.90 (4.70–640.90)	0.001 <sup>#</sup>
Detectable urine IgG	39.90 (9.25–172.10)	<0.001 <sup>#</sup>	59.37 (8.54–412.79)	<0.001 <sup>#</sup>
Serum uromodulin, per 1 µg/l	0.99 (0.98–1.00)	0.049 <sup>#</sup>	0.99 (0.98–1.00)	0.09
Urine uromodulin, per 1 mg/l	0.96 (0.89–1.02)	0.2	0.95 (0.88–1.03)	0.2
Urine uromodulin/creatinine, per 1 mg/g	1.00 (0.95–1.06)	0.9	1.01 (0.95–1.07)	0.8

<sup>#</sup>Statistically significant result. Abbreviations: see Table 1.

**3.3. Correlations of Studied Markers with eGFR, Albuminuria, Diabetes Duration, and Diabetes Control.** Except for serum cystatin C, the studied serum and urine markers of renal function did not significantly correlate with eGFR based on serum creatinine (Table 4). Patients with detectable IgG and those with detectable transferrin had on average lower eGFR values (median 86 and 83 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, resp.) than those with undetectable concentrations (median 93 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> for both patients with undetectable IgG and those with undetectable transferrin); however, the differences were not statistically significant ( $p = 0.2$  in case of transferrin,  $p = 0.3$  in case of IgG).

Urine albumin, albumin/creatinine ratio, NGAL/creatinine ratio, and IgG significantly correlated with known duration of diabetes (Table 4). However, only serum cystatin C ( $R = 0.61$ ;  $p < 0.001$ ) and serum uromodulin ( $R = -0.26$ ;  $p = 0.018$ ) were significantly correlated with age. Moreover, urine albumin, uACR, urine NGAL and NGAL/creatinine ratio, urine transferrin, urine IgG, urine uromodulin, and uromodulin/creatinine ratio significantly correlated with diabetes control as reflected by HbA<sub>1c</sub> concentrations. Urine markers NGAL, KIM-1, IgG, and transferrin were correlated with albuminuria (Table 4). Except for serum NGAL ( $R = 0.45$ ;  $p < 0.001$ ), the studied markers were not correlated with C-reactive protein. Also, none correlated with BMI. None of the studied markers differed significantly between men and women, between patients with and without hypertension, or between those treated and not treated with renin-angiotensin-aldosterone inhibitors.

**3.4. Associations between Concentrations of Studied Markers and Follow-Up Data.** Among 29 patients (36% of the study group), the retrospective data were available that had been recorded one year before the study visit. The retrospective data included eGFR and uACR values. During the year, GFR decreased in 17 patients (59%) (Table 5). Median decrease equaled 5.2 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, that is, 7.6% of the

initial eGFR value. Among studied markers, only higher NGAL concentrations both in serum and in urine were significantly associated with decrease in eGFR (Table 5). Moreover, the concentrations of serum NGAL, urine NGAL, and urine NGAL/creatinine ratios correlated negatively with the percentage changes in eGFR over the year (Figure 2).

During the one-year observation, uACR increased in 10 patients (34%), with median increase of 12.2 mg/g. We observed no relationship between the decrease in eGFR and the increase in albuminuria ( $p = 0.9$ ). However, higher urine NGAL, urine NGAL/creatinine ratio, urine KIM-1/creatinine ratio, and detectable urine IgG were significantly associated with the increase in uACR (Figure 3).

We compared the longitudinal data (i.e., the incidence of decrease in eGFR and increase in uACR over one-year observation) between patients with studied markers below and above the cut-off values selected in a cross-sectional study (as presented in Table 3). Serum NGAL above 61 µg/l was the only marker significantly associated with more prevalent decrease in eGFR (it occurred in 53% of patients with serum NGAL above the cut-off versus 17% of those with serum NGAL below the cut-off;  $p = 0.047$ ). However, several markers were associated with more prevalent increase in uACR, that is, urine NGAL above 14.3 µg/l (70% versus 32%;  $p = 0.048$ ), urine NGAL/creatinine above 28.3 µg/g (50% versus 11%;  $p = 0.023$ ), urine KIM-1/creatinine above 1.81 µg/g (50% versus 11%;  $p = 0.018$ ), and urine IgG above 3.49 mg/l (50% versus 5%;  $p = 0.005$ ).

## 4. Discussion

Based on KDOQI definitions [4, 10], DKD diagnosis is based on increased albuminuria and decreased eGFR. However, there are several weaknesses of albuminuria as a marker of (early) DKD. Most importantly, among T2DM who develop kidney disease associated with decrease in glomerular filtration, there are about 30–45%

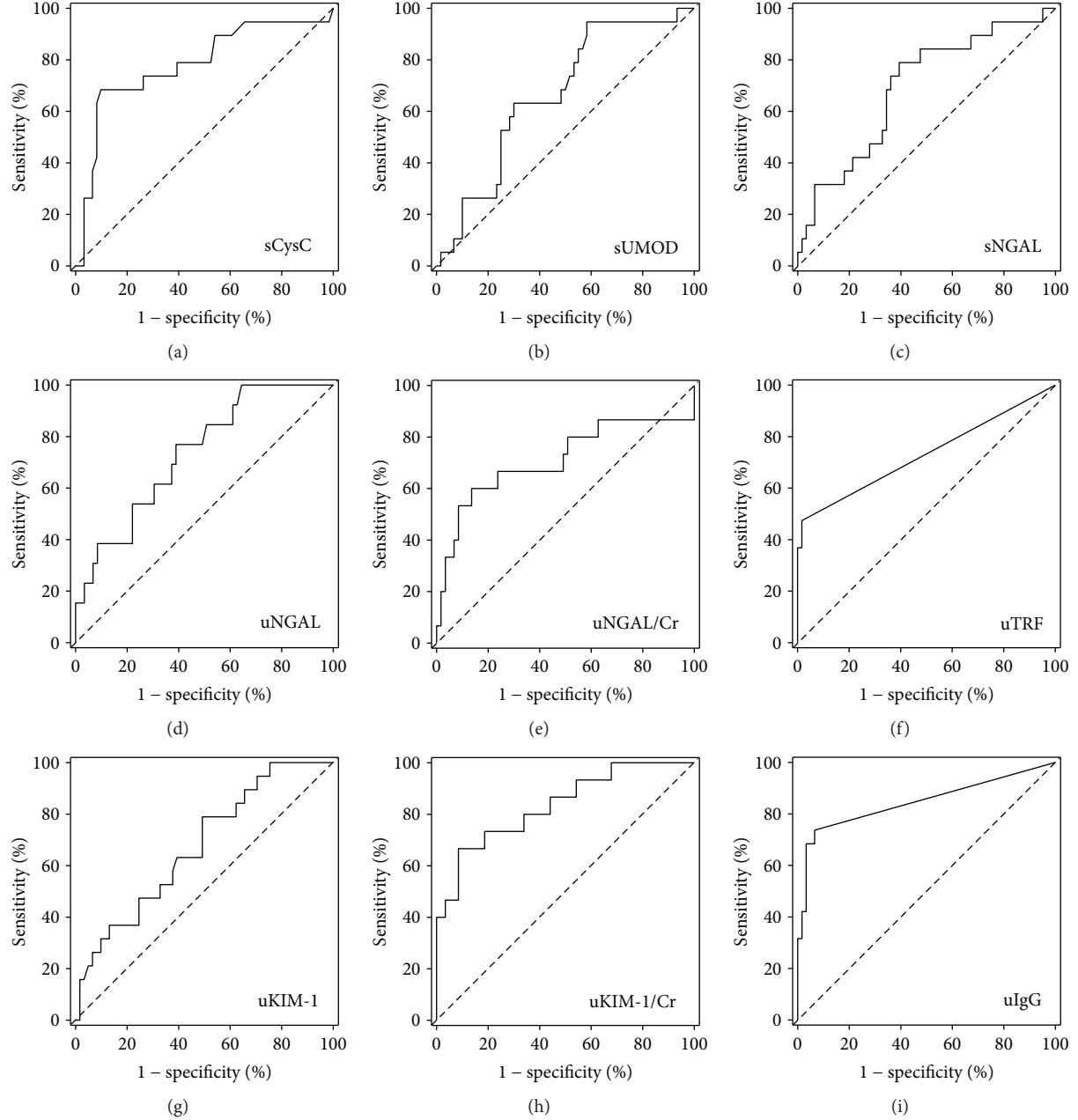


FIGURE 1: Receiver operating characteristic curves for selected serum and urine markers used to diagnose moderately increased albuminuria (uACR between 30 and 300 mg/g) among T2DM patients with eGFR > 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>: (a) serum cystatin C (sCysC); (b) serum uromodulin (sUMOD); (c) serum NGAL (sNGAL); (d) urine NGAL (uNGAL); (e) urine NGAL/creatinine (uNGAL/Cr); (f) urine transferrin (uTRF); (g) urine KIM-1 (uKIM-1); (h) urine KIM-1/creatinine (uKIM-1/Cr); (i) urine IgG (uIgG).

in whom no increased albuminuria (of above 30 mg/g creatinine) is observed [15, 16]. Further, albuminuria is not specific for DKD, and the comorbidities often observed in T2DM (such as hypertension or obesity) may also affect the filtration barrier of the glomeruli leading to increased albuminuria [17]. Moreover, treatment of hypertension often includes renin-angiotensin-aldosterone inhibitors (angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers) that lower hydrostatic pressure in glomeruli and thus normalize albuminuria. Although beneficial, this effect influences the diagnosis of DKD based on

current guidelines [10]. There is an ongoing debate on lowering the cut-off value for albuminuria; evidence exists that the urine albumin/creatinine ratio exceeding 15 mg/g should be used to define chronic kidney disease as it better predicts kidney disease-related cardiovascular complications [18]. On the other hand, decreased eGFR occurs rather late following changes in the kidney in DKD, the early damage being often accompanied by hyperfiltration [19]. Both routine markers of DKD (albuminuria and eGFR) are altered in consequence of the damage to renal glomeruli. However, in about 30% of T2DM patients with kidney impairment,

TABLE 3: Diagnostic accuracy data for selected serum and urine markers used to diagnose moderately increased albuminuria (uACR between 30 and 300 mg/g) among T2DM patients with eGFR > 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. Values observed in healthy individuals are shown to enable comparison with selected cut-off values.

Marker	Reference values previously associated with healthy individuals	Detection of moderately increased albuminuria in T2DM			
		AUC (95% CI)	Selected cut-off value	Sensitivity, %	Specificity, %
Serum cystatin C, mg/l	0.59–1.04 <sup>a</sup>	0.78 (0.65–0.91)	1.09	68	90
Serum NGAL, µg/l	Men 63.5 ± 33.4 Women 64.9 ± 46.5 <sup>b</sup>	0.69 (0.56–0.83)	61.0	79	61
Urine NGAL, µg/l	10.9 (6.0–38.2) <sup>c</sup>	0.74 (0.60–0.87)	14.3	80	61
Urine NGAL/creatinine, µg/g	12.2 (5.9–27.9) <sup>c</sup>	0.71 (0.53–0.89)	28.3	60	87
Urine KIM-1, µg/l	0.156–5.33 <sup>b</sup>	0.68 (0.54–0.81)	0.73	79	51
Urine KIM-1/creatinine, µg/g	0.225–3.20 <sup>b</sup>	0.84 (0.72–0.95)	1.81	67	92
Urine transferrin, mg/l	<2.17 <sup>a</sup>	0.73 (0.58–0.88)	2.41	47	98
Urine IgG, mg/l	<3.36 <sup>a</sup>	0.85 (0.72–0.97)	3.49	74	93
Serum uromodulin, µg/l*	191.2 (89.1–299.1) <sup>c</sup>	0.66 (0.53–0.80)	144	95	43

<sup>a</sup>Reference interval used in the laboratory that performed the measurement for the present study. <sup>b</sup>Reference values reported by the manufacturer of the test used in the present study [43–45]. <sup>c</sup>Previously reported values measured in the same laboratory and with the same tests as in the present study: urine NGAL, urine NGAL/creatinine [46], and serum uromodulin [38]. \*Low concentrations are associated with renal impairment. Abbreviations: see Table 1.

TABLE 4: Correlations between studied serum and urine markers and eGFR, diabetes duration, and HbA<sub>1c</sub> concentrations.

Marker	eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> )		Diabetes duration		HbA <sub>1c</sub>		uACR	
	R	p value	R	p value	R	p value	R	p value
Serum cystatin C	-0.72	<0.001 <sup>#</sup>	0.17	0.1	-0.05	0.7	0.21	0.08
Urine albumin	0.02	0.9	0.21	0.071	0.28	0.020 <sup>#</sup>	NA	
Urine albumin/creatinine	-0.01	0.9	0.25	0.037 <sup>#</sup>	0.29	0.015 <sup>#</sup>	NA	
Serum NGAL	-0.15	0.2	0.09	0.4	0.10	0.4	0.13	0.3
Urine NGAL	-0.06	0.6	0.19	0.1	0.24	0.048 <sup>#</sup>	0.39	<0.001 <sup>#</sup>
Urine NGAL/creatinine	-0.05	0.7	0.24	0.046 <sup>#</sup>	0.25	0.035 <sup>#</sup>	0.36	0.002 <sup>#</sup>
Urine KIM-1	0.11	0.4	-0.03	0.8	0.08	0.5	0.32	0.005 <sup>#</sup>
Urine KIM-1/creatinine	0.05	0.7	0.05	0.7	0.16	0.2	0.45	<0.001 <sup>#</sup>
Urine transferrin	-0.17	0.1	0.19	0.1	0.32	0.006 <sup>#</sup>	0.48	<0.001 <sup>#</sup>
Urine IgG	-0.14	0.2	0.27	0.016 <sup>#</sup>	0.33	0.005 <sup>#</sup>	0.61	<0.001 <sup>#</sup>
Serum uromodulin	0.16	0.2	0.06	0.6	0.03	0.8	-0.09	0.4
Urine uromodulin	0.08	0.5	-0.14	0.2	-0.35	0.002 <sup>#</sup>	-0.03	0.8
Urine uromodulin/creatinine	0.04	0.7	-0.12	0.3	-0.32	0.009 <sup>#</sup>	0.01	0.9

\*Statistically significant correlation. Abbreviations: see Table 1; NA: not applicable.

changes in renal interstitium and tubules precede damage of glomeruli [20]. Nevertheless, markers of tubular damage are currently not a part of routine assessment of T2DM patients. Our study is a part of extensive efforts aiming at the evaluation of other urinary and serum markers for their possible usefulness in early diagnosis of DKD. However, we used eGFR and albuminuria as the standard indicators of renal function at baseline and after one year of follow-up.

Our study recruited patients without significant decrease in eGFR and without severely increased albuminuria. According to currently accepted definitions [11], in individuals with eGFR > 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, moderately increased albuminuria serves as the evidence of stage A2 chronic kidney disease. In our study, patients with A2 albuminuria presented higher concentrations of most studied markers of both glomerular (serum cystatin C, urine IgG, and

transferrin) and tubular damage (urine and serum NGAL, urine KIM-1), as well as lower serum concentrations of uromodulin. A2 patients were older, with longer history of diabetes, and there was a positive correlation between albuminuria and diabetes control, similar to previous reports [21]. Still, in case of urine IgG, transferrin, NGAL, and KIM-1, the difference between A1 and A2 subgroups remained significant after adjustment for age, diabetes duration, and comorbidities (hypertension and heart failure) as well as treatment with renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors.

Using ROC curves analysis, we determined the cut-off values that best discriminate between A1 and A2 patients. The cut-off values for studied markers of glomerular damage, that is, serum cystatin C, urine IgG, and transferrin were higher as compared with upper reference limits

TABLE 5: Characteristics of 29 patients for whom retrospective longitudinal data were available. The group was divided according to changes in eGFR over one-year observation.

Characteristic	Patients with decrease in eGFR (N = 17)	Patients without decrease in eGFR (N = 12)	p value
Age, years	64 ± 15	63 ± 11	0.4
Male sex, N (%)	11 (65)	6 (50)	0.4
Known diabetes duration, years	7 (2–11)	10 (4–11)	0.4
HbA <sub>1c</sub> , %	6.10 (5.70–6.45)	6.20 (5.70–7.00)	0.7
Serum creatinine, µmol/l	61.9 (59.2–72.5)	68.9 (61.4–77.8)	0.5
eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ), ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	91 (81–98)	96 (80–99)	0.8
Serum cystatin C, mg/l	0.92 (0.82–1.14)	0.86 (0.76–1.10)	0.2
eGFR (CKD-EPI <sub>CysC</sub> ), ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	87 (67–96)	96 (70–105)	0.2
Urine albumin, mg/l	8.06 (6.76–13.53)	10.18 (6.21–14.65)	0.9
Urine albumin/creatinine, mg/g	7.93 (3.38–13.38)	8.07 (5.50–16.4)	0.6
Serum NGAL, µg/l	66.7 (49.7–72.3)	44.4 (39.7–55.0)	0.028 <sup>#</sup>
Urine NGAL, µg/l	15.3 (4.0–31.5)	2.9 (1.9–18.5)	0.048 <sup>#</sup>
Urine NGAL/creatinine, µg/g	6.47 (3.36–45.78)	8.82 (2.42–20.3)	0.3
Urine KIM-1, µg/l	1.05 (0.42–1.64)	1.12 (0.35–1.69)	0.9
Urine KIM-1/creatinine, µg/g	1.01 (0.55–1.58)	1.34 (0.59–2.23)	0.5
Urine transferrin, mg/l	<2.17	<2.17	0.1
Detectable urine transferrin (≥2.17 mg/l), N (%)	0	2 (17)	0.08
Urine IgG, mg/l	<3.36	<3.36 (<3.36–4.00)	0.2
Detectable urine IgG (≥3.36 mg/l), N (%)	2 (12)	4 (33)	0.2
Serum uromodulin, µg/l	125 (97–142)	105 (61–144)	0.5
Urine uromodulin, mg/l	11.30 (6.38–15.50)	4.94 (2.99–14.41)	0.3
Urine uromodulin/creatinine, mg/g	11.20 (6.67–23.17)	10.07 (4.51–15.34)	0.5

<sup>#</sup>Statistically significant difference between the groups. Abbreviations: see Table 1.

established in healthy individuals. A substantial proportion (18%) of G1-G2/A1 patients presented with serum cystatin C above the upper reference limit, in line with previous reports [22, 23]. In our study, neither of the tubular markers was significantly correlated with eGFR based on serum creatinine. Moreover, serum creatinine and eGFR based on creatinine did not differ between our A1 and A2 patients, while serum cystatin C and eGFR based on cystatin C differed significantly. The KDIGO guidelines [11] recommend the estimation of GFR based on serum cystatin C in adult patients with suspected stage G3a of chronic kidney disease (GFR between 45 and 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>). Our results suggest that measurements of serum cystatin C accompanied by calculation of eGFR with the use of CKD-EPI<sub>CysC</sub> equation may be useful already at the earlier stages of diabetic kidney disease. The recently performed laboratory standardization of cystatin C measurements is also the advantage that must be remembered.

Urine IgG and transferrin excretion has been previously observed in normoalbuminuric patients with diabetes and has been associated with hypertension and hyperfiltration [24, 25]. In accordance with previous studies [26, 27], we observed increased urine IgG and transferrin in a subgroup with moderately increased albuminuria and both proteins were specific markers of kidney disease. These are notable observations, especially considering high molecular weight

of IgG (150 kDa) that preserves the protein from being filtered by healthy glomeruli [28].

In our study, both urine NGAL and KIM-1 correlated positively with albuminuria, consistently with previous reports regarding patients with T2DM [29–31] and were significantly higher in patients with moderately increased albuminuria. Nauta et al. [32] observed higher concentrations of urine NGAL and KIM-1 in normoalbuminuric diabetic patients comparing to healthy subjects. Also, we have previously reported increased urine NGAL concentrations among patients with early stages or risk for DKD [33], similarly to other groups [34, 35].

Tamm-Horsfall's protein or uromodulin is the main protein present in normal urine. This glycoprotein is exclusively expressed in the thick ascending limb of the loop of Henle and proximal part of the distal renal tubule and is released to urine by partial proteolysis [36]. It was demonstrated that the damage of renal tubules in chronic kidney disease (including early stages: G1 and G2) was associated with reduced concentrations of uromodulin in both urine and serum [37–39], which reflects a pathophysiological difference of this glycoprotein compared to other renal tubule injury markers. In our study, neither serum nor urine concentrations of uromodulin were correlated with albuminuria. Moreover, we have not observed correlations between uromodulin and eGFR. However, an interesting observation

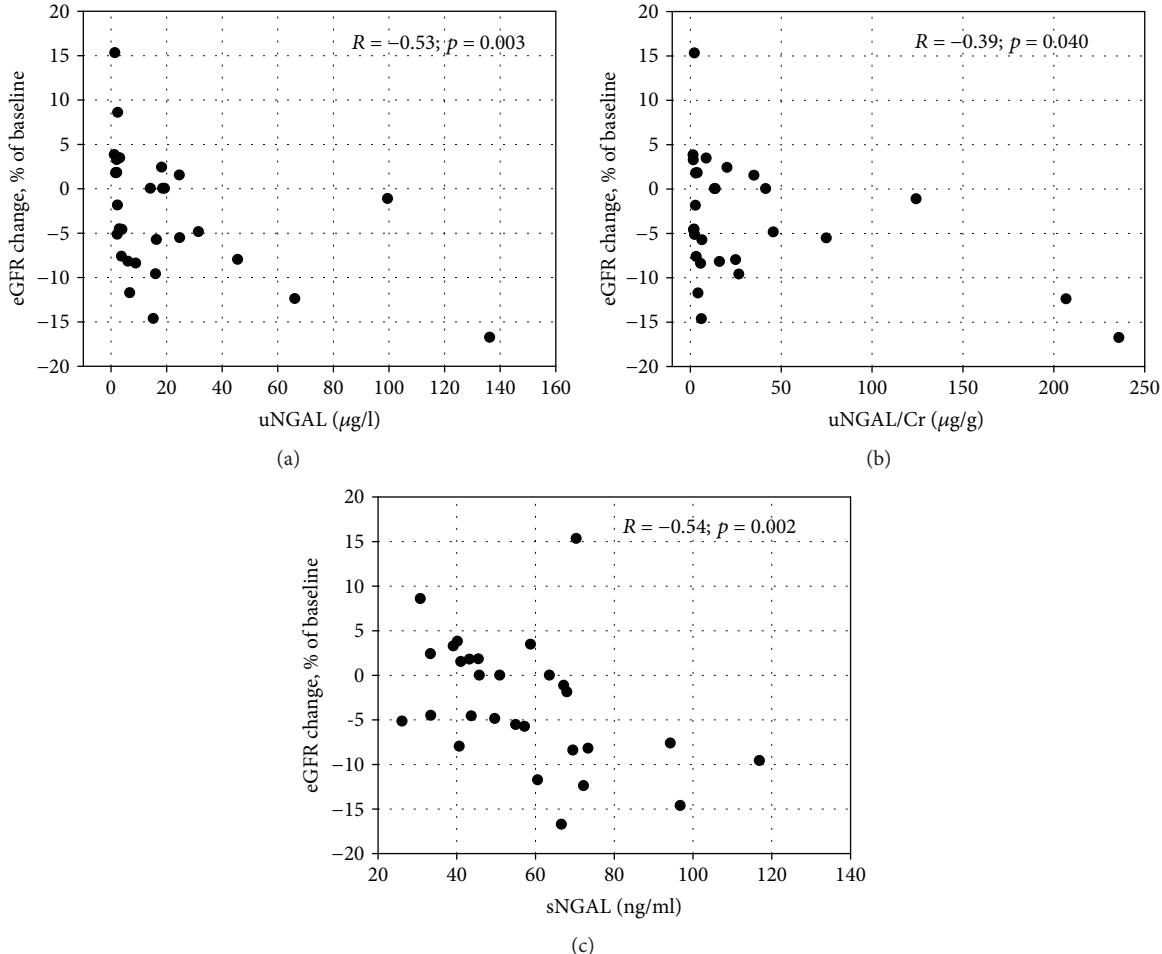


FIGURE 2: The correlations between percentage change in eGFR values over one-year observation and urine NGAL concentrations (a), urine NGAL/creatinine ratios (b), serum NGAL concentrations (c) among 29 patients for whom retrospective data were available. Change in eGFR was calculated as  $[(\text{control eGFR} - \text{baseline eGFR})/\text{baseline eGFR}] * 100\%$ . Spearman R coefficients and  $p$  values are shown on the graphs.

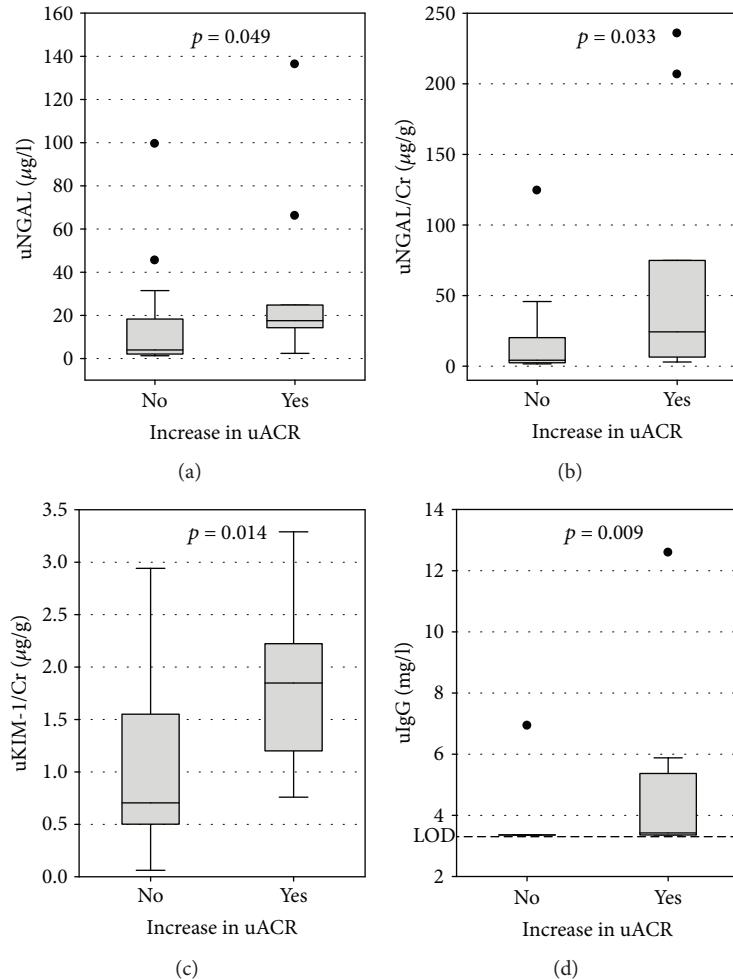
is negative correlation between  $\text{HbA}_{1c}$  and urine uromodulin, suggesting tubular impairment among patients with worse glycemic control. Previously, Leiherer et al. [40] demonstrated decreased concentrations of uromodulin in urine of patients with impaired carbohydrate metabolism, including ones with T2DM.

From practical point of view, it is important for clinical practitioners that both glomerular (albumin, uACR) and tubular (urine NGAL, transferrin, IgG, and uromodulin) markers positively correlated with glycemic control, as assessed with  $\text{HbA}_{1c}$  measurements. Hence, good glycemic control is important both for the glomeruli and tubules in the early stages of diabetic nephropathy.

In a subgroup of patients, we were able to obtain longitudinal data on changes in standard measures of renal function (eGFR and uACR) over one-year observation. During the year, patients were treated according to current recommendations [12]. The concentrations of NGAL in both serum and urine as well as urine NGAL/creatinine ratios were correlated with decline in eGFR. We did not observe significant correlations between eGFR changes and other studied glomerular or tubular biomarkers. This may be caused by

the small number of patients in the longitudinally observed subgroup, as well as by the relatively short period of observation [14]. However, we were able to show significant associations between the concentrations of KIM-1, NGAL, and IgG in urine and the increase in uACR in longitudinal observation. Urine KIM-1/creatinine ratio and NGAL/creatinine ratio were also examined by Nowak et al. [41] who studied the association of the markers with decline in kidney function in T2DM patients over a follow-up period of 5–12 years. Both markers were significantly associated with renal decline in simple analysis; however, in case of the NGAL/creatinine ratio, the association was weak and only KIM-1 remained a significant predictor in multiple analysis. To the contrary, we have not observed the correlation between urine KIM-1 or KIM-1/creatinine ratio and eGFR decline, although it correlated with the increase in albuminuria.

Our study, in accordance to previous ones, suggests that various pathways may be involved in early renal damage among T2DM patients [35, 41, 42]. Although albuminuria remains one of the most significant predictors of renal decline [42], other markers, such as serum and urine NGAL,



**FIGURE 3:** The associations between increase in urine albumin/creatinine ratio (uACR) over one-year observation and urine NGAL concentrations (a), urine NGAL/creatinine ratios (b), urine KIM-1/creatinine ratios (c), and urine IgG concentrations (d) among 29 patients for whom retrospective data were available. Data are shown as median, interquartile range (box), nonoutlier range (whiskers), and outliers (points). LOD indicates the limit of detection of urine IgG; *p* values in Mann–Whitney’s test are shown on the graphs.

serum cystatin C, urine KIM-1, IgG, and transferrin, may add to the early diagnosis of diabetic kidney disease.

The main limitations of our study are the cross-sectional setting and relatively low number of patients. In a subgroup of patients, we were able to obtain the longitudinal data on changes in standard measures of renal function (eGFR, uACR); however, these are retrospective data, and the number of patients is small. In this subgroup of patients, the studied markers were measured at the end of the follow-up, so we were only able to evaluate the associations between the studied markers and the changes in renal function during the preceding year. The diagnosis of kidney disease was not confirmed by renal biopsy, as our patients did not have clinical indications for biopsy. Therefore, we adopted surrogate markers of kidney disease, that is, the presence of moderately increased albuminuria, decrease in eGFR, and increase in uACR. Also, lack of the control group studied simultaneously with the patients’ group limits our findings; however, we

relied on previous experience of our laboratory with most studied markers.

In summary, the recruitment of the uniform group of T2DM patients with  $\text{eGFR} > 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$  and  $\text{uACR} < 300 \text{ mg/g}$ , with exclusion of important interfering conditions, enabled us to study the concentrations of selected glomerular and tubular markers in early stages of DKD. In most of our patients, the diabetes duration was below 10 years and the diabetes was well controlled. Both glomerular (serum cystatin C, urine IgG, and transferrin) and tubular (urine NGAL, KIM-1 and uromodulin) markers differed significantly between patients with moderately increased albuminuria comparing to those with normal to mildly increased albuminuria. Serum and urine NGAL were significantly associated with eGFR decline. Our findings indicate that the widely available markers such as serum cystatin C, urine IgG, transferrin, and NGAL may help in early assessment of kidney disease in T2DM patients, although large prospective studies are needed to confirm the conclusion.

## Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

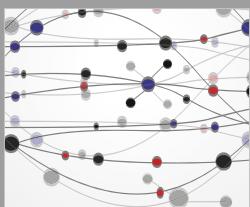
## Acknowledgments

The work was partly financed from Jagiellonian University Medical College, Grant no. K/ZDS/006347.

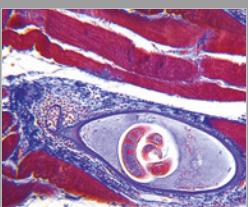
## References

- [1] International Diabetes Federation, *IFD Diabetes Atlas*, International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 7th edition, 2015, <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
- [2] E. Macisaac, E. I. Ekinci, and G. Jeremus, "Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 63, no. 2, Supplement 2, pp. S39–S62, 2014.
- [3] M. Narres, H. Claessen, S. Droste et al., "The incidence of end-stage renal disease in the diabetic (compared to the non-diabetic) population: a systematic review," *PLoS One*, vol. 11, no. 1, article e0147329, 2016.
- [4] National Kidney Foundation, "KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 49, no. 2, Supplement 2, pp. S12–S154, 2007.
- [5] M. Boronat, C. Garcia-Canto, V. Quevedo et al., "Non-albuminuric renal disease among subjects with advanced stages of chronic kidney failure related to type 2 diabetes mellitus," *Renal Failure*, vol. 36, no. 2, pp. 166–170, 2014.
- [6] Z. Ilyas, J. T. Chaiban, and A. Krikorian, "Novel insights into the pathophysiology and clinical aspects of diabetic nephropathy," *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, vol. 18, no. 1, pp. 21–28, 2017.
- [7] C. Gluhovschi, G. Gluhovschi, L. Petrica et al., "Urinary biomarkers in the assessment of early diabetic nephropathy," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2016, Article ID 4626125, 13 pages, 2016.
- [8] G. Currie, G. McKay, and C. Delles, "Biomarkers in diabetic nephropathy: present and future," *World Journal of Diabetes*, vol. 5, no. 6, pp. 763–776, 2014.
- [9] A. Żyłka, A. Gala-Błędzińska, P. Dumnicka et al., "Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes," *Disease Markers*, vol. 2016, Article ID 8489543, 8 pages, 2016.
- [10] National Kidney Foundation, "KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 update," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 60, no. 5, pp. 850–886, 2012.
- [11] A. Levin, P. E. Stevens, R. W. Bilous et al., "Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease," *Kidney International Supplements*, vol. 3, no. 1, pp. 1–150, 2013.
- [12] American Diabetes Association, "Standards of medical care in diabetes—2014," *Diabetes Care*, vol. 37, Supplement 1, pp. S14–S80, 2014.
- [13] A. S. Krolewski, "Progressive renal decline: the new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes," *Diabetes Care*, vol. 38, no. 6, pp. 954–962, 2015.
- [14] J. Coresh, T. C. Turin, K. Matsushita et al., "Decline in estimated glomerular filtration rate and subsequent risk of end-stage renal disease and mortality," *JAMA*, vol. 311, no. 24, pp. 2518–2531, 2014.
- [15] R. J. Macisaac and G. Jerums, "Diabetic kidney disease with and without albuminuria," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 20, no. 3, pp. 246–257, 2011.
- [16] S. S. Kim, S. H. Song, I. J. Kim et al., "Nonalbuminuric proteinuria as a biomarker for tubular damage in early development of nephropathy with type 2 diabetic patients," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 30, no. 8, pp. 736–741, 2014.
- [17] E. G. Duran-Perez, P. Almeda-Valdes, D. Cuevas-Ramos, E. Campos-Barrera, L. Muñoz-Hernandez, and F. J. Gomez-Perez, "Treatment of metabolic syndrome slows progression of diabetic nephropathy," *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, vol. 9, no. 6, pp. 483–489, 2011.
- [18] J. C. Verhave, R. T. Gansevoort, H. L. Hillege, S. J. Bakker, D. De Zeeuw, and P. E. de Jong, "An elevated urinary albumin excretion predicts de novo development of renal function impairment in the general population," *Kidney International*, vol. 66, Supplement 92, pp. S18–S21, 2004.
- [19] R. Trevisan and A. R. Dodesini, "The hyperfiltering kidney in diabetes," *Nephron*, vol. 136, no. 4, pp. 277–280, 2017.
- [20] R. Retnakaran, C. A. Cull, K. Thorne, A. I. Adler, R. R. Holman, and UKPDS Study Group, "Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. prospective diabetes study 74," *Diabetes*, vol. 55, no. 6, pp. 1832–1839, 2006.
- [21] N. R. Robles, J. Villa, F. J. Felix, D. Fernandez-Berges, and L. Lozano, "Non-proteinuric diabetic nephropathy is the main cause of chronic kidney disease: results of a general population survey in Spain," *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, vol. 11, Supplement 2, pp. S777–S781, 2017.
- [22] J. M. López Gómez, B. Sacristán Enciso, M. Micó, F. Arias Meneses, M. F. de Sande, and S. Alejo, "Serum cystatin C and microalbuminuria in the detection of vascular and renal damage in early stages," *Nefrología*, vol. 31, no. 5, pp. 560–566, 2011.
- [23] L. H. Xia, X. G. Bing, and X. T. An, "Serum cystatin C assay for the detection of early renal impairment in diabetic patients," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 18, no. 1, pp. 31–35, 2004.
- [24] T. Narita, H. Sasaki, M. Hosoba et al., "Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients," *Diabetes Care*, vol. 27, no. 5, pp. 1176–1181, 2004.
- [25] N. Ohara, O. Hanyu, S. Hirayama et al., "Hypertension increases urinary excretion of immunoglobulin G, ceruloplasmin and transferrin in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus," *Journal of Hypertension*, vol. 32, no. 2, pp. 432–438, 2014.
- [26] X. Jiang, Q. Zhang, H. B. Wang, X. F. Cui, and R. Liu, "Associations of urinary, glomerular, and tubular markers with the development of diabetic kidney disease in type 2 diabetes patients," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 32, no. 1, 2018.

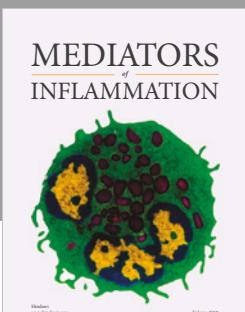
- [27] K. Al-Rubeaan, K. Siddiqui, M. A. Al-Ghonaim, A. M. Youssef, A. H. Al-Sharqawi, and D. Al-Naqeb, "Assessment of the diagnostic value of different biomarkers in relation to various stages of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, article 2684, 2017.
- [28] A. Cohen-Bucay and G. Viswanathan, "Urinary markers of glomerular injury in diabetic nephropathy," *International Journal of Nephrology*, vol. 2012, Article ID 146987, 11 pages, 2012.
- [29] L. Petrica, A. Vlad, G. Gluhovschi et al., "Proximal tubule dysfunction is associated with podocyte damage biomarkers nephrin and vascular endothelial growth factor in type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study," *PLoS One*, vol. 9, no. 11, article e112538, 2014.
- [30] G. D. Fuffa, E. J. Weil, R. G. Nelson et al., "Association of urinary KIM-1, L-FABP, NAG and NGAL with incident end-stage renal disease and mortality in American Indians with type 2 diabetes mellitus," *Diabetologia*, vol. 58, no. 1, pp. 188–198, 2015.
- [31] J. de Carvalho, E. Tatsch, B. S. Hausen et al., "Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes," *Clinical Biochemistry*, vol. 49, no. 3, pp. 232–236, 2016.
- [32] F. L. Nauta, W. E. Boertien, S. J. L. Bakker et al., "Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes," *Diabetes Care*, vol. 34, no. 4, pp. 975–981, 2011.
- [33] A. Gala-Błędzińska, P. Dumnicka, B. Kuśnierz-Cabala et al., "Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is complementary to albuminuria in diagnosis of early-stage diabetic kidney disease in type 2 diabetes," *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 4691389, 7 pages, 2017.
- [34] D. Bolignano, A. Lacquaniti, G. Coppolino et al., "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients," *Kidney & Blood Pressure Research*, vol. 32, no. 2, pp. 91–98, 2009.
- [35] X. F. Zeng, D. X. Lu, J. M. Li et al., "Performance of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin, clusterin, and cystatin C in predicting diabetic kidney disease and diabetic microalbuminuria: a consecutive cohort study," *BMC Nephrology*, vol. 18, no. 1, p. 233, 2017.
- [36] P. Vyletal, A. J. Bleyer, and S. Kmoch, "Uromodulin biology and pathophysiology—an update," *Kidney & Blood Pressure Research*, vol. 33, no. 6, pp. 456–475, 2010.
- [37] S. Prajczter, U. Heidenreich, W. Pfaller, P. Kotanko, K. Lhotta, and P. Jennings, "Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 25, no. 6, pp. 1896–1903, 2010.
- [38] D. Fedak, M. Kuśniewski, A. Fugiel et al., "Serum uromodulin concentrations correlate with glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease," *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, vol. 126, no. 12, pp. 995–1004, 2016.
- [39] L. Risch, K. Lhotta, D. Meier, P. Medina-Escobar, U. E. Nydegger, and M. Risch, "The serum uromodulin level is associated with kidney function," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 52, no. 12, pp. 1755–1761, 2014.
- [40] A. Leiherer, A. Muendlein, C. H. Saely et al., "Serum uromodulin is associated with impaired glucose metabolism," *Medicine*, vol. 96, no. 5, article e5798, 2017.
- [41] N. Nowak, J. Skupien, A. M. Smiles et al., "Markers of early progressive renal decline in type 2 diabetes suggest different implications for etiological studies and prognostic tests development," *Kidney International*, vol. 93, no. 5, pp. 1198–1206, 2018.
- [42] M. J. Pena, A. Heinzel, G. Heinze et al., "A panel of novel biomarkers representing different disease pathways improves prediction of renal function decline in type 2 diabetes," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, article e0120995, 2015.
- [43] D. Stejskal, M. Karpísek, V. Humenanska et al., "Lipocalin-2: development, analytical characterization, and clinical testing of a new ELISA," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 40, no. 6, pp. 381–385, 2008.
- [44] V. Pennemans, J. M. Rigo, C. Faes, C. Reynders, J. Penders, and Q. Swennen, "Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population: are age and gender an issue?", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 51, no. 9, pp. 1795–1802, 2013.
- [45] F. Waanders, M. M. van Timmeren, C. A. Stegeman, S. J. Bakker, and H. van Goor, "Kidney injury molecule-1 in renal disease," *The Journal of Pathology*, vol. 220, no. 1, pp. 7–16, 2010.
- [46] A. Gala-Błędzińska, A. Żyłka, K. Rybak, P. Dumnicka, M. Kuśniewski, and B. Kuśnierz-Cabala, "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," *Diagnostyka Laboratoryjna*, vol. 51, pp. 97–104, 2015.



**The Scientific  
World Journal**



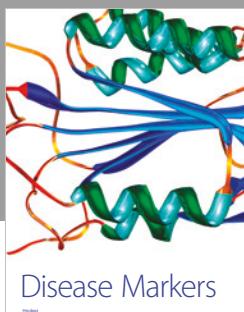
Gastroenterology  
Research and Practice



MEDIATORS  
of  
INFLAMMATION



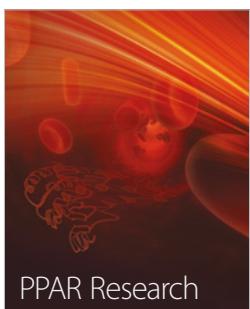
Journal of  
Diabetes Research



Disease Markers



Journal of  
Immunology Research

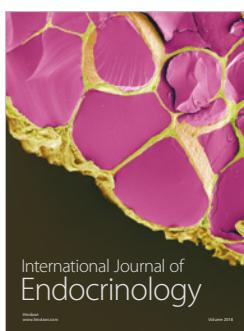


PPAR Research



**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
[www.hindawi.com](http://www.hindawi.com)



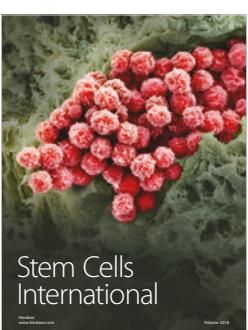
International Journal of  
Endocrinology



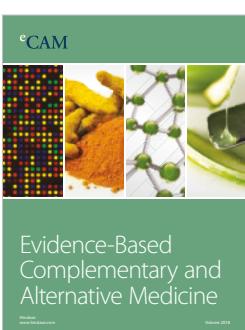
BioMed  
Research International



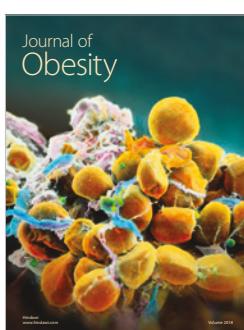
Journal of  
Ophthalmology



Stem Cells  
International



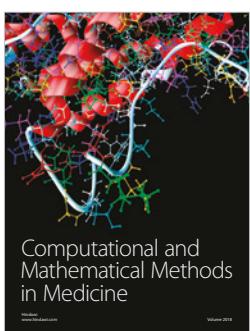
eCAM  
Evidence-Based  
Complementary and  
Alternative Medicine



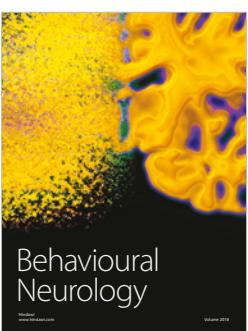
Journal of  
Obesity



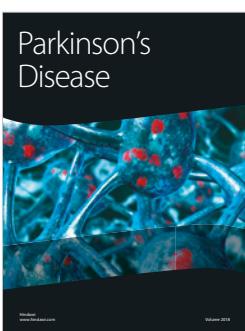
Journal of  
Oncology



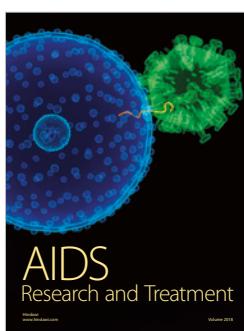
Computational and  
Mathematical Methods  
in Medicine



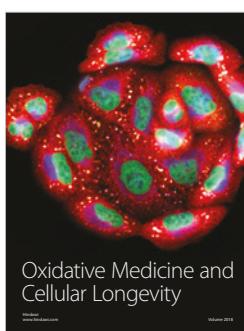
Behavioural  
Neurology



Parkinson's  
Disease



AIDS  
Research and Treatment



Oxidative Medicine and  
Cellular Longevity

## **7. Oświadczenia współautorów**

**Prof. dr hab. n. med. Piotr Ceranowicz**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 10. 08. 2018 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Disease Markers*. 2016; Doi. org/10.1155/2016/8489543.
2. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation*. 2018; Doi: org. 10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział w opracowaniu manuskryptu, korekta opracowania, przygotowanie piśmiennictwa oraz udział w procesie publikacji i korespondencji autorskiej*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.

*Piotr Ceranowicz*

.....  
podpis wnioskodawcy

**Dr hab. n. med. Ryszard Drożdż**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 10. 08. 2018 r.

## OŚWIADCZENIE

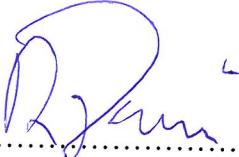
Jako współautor prac pt.:

1. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Rybak K., Dumnicka P., Drożdż R., Kuśnierz-Cabala B.: Role of New biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. *Folia Med. Cracov.* 2015; 55(4): 21-33.
2. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation.* 2018; Doi: org/10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*przeprowadzenie oznaczeń białek swoistych, pomoc w opracowaniu materiału i dyskusji*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.



.....  
podpis wnioskodawcy

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. Gala-Błędzińska A., Żyłka A., Rybak K., Dumnicka P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Użyteczność lipokaliny związanej z żelatyną neutrofilów (NGAL) i wyliczanego wskaźnika NGAL do kreatyniny w moczu jako wczesnych predyktorów uszkodzenia nerek u pacjentów z cukrzycą typu 2. *Diagn. Lab.* 2015; 51(2): 97-104.
2. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Disease Markers.* 2016; Doi. org/10.1155/2016/8489543.
3. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Rybak K., Dumnicka P., Drożdż R., Kuśnierz-Cabala B.: Role of New biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. *Folia Med. Cracov.* 2015; 55(4): 21-33.
4. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation.* 2018; Doi: org/10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu, udział w opracowaniu statystycznym bazy danych i dyskusja wyników i korekta językowa manuskryptu*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.

*Pauline Dumnicka*

podpis wnioskodawcy

**Dr n. med. Agnieszka Gala-Błędzińska**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 10.08.2018 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.:

1. Gala-Błędzińska A., Żyłka A., Rybak K., Dumnicka P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Użyteczność lipokaliny związanej z żelatyną neutrofilów (NGAL) i wyliczanego wskaźnika NGAL do kreatyniny w moczu jako wczesnych predyktorów uszkodzenia nerek u pacjentów z cukrzycą typu 2. *Diagn. Lab.* 2015; 51(2): 97-104.
2. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszański R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Disease Markers.* 2016; Doi. org/10.1155/2016/8489543.
3. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Rybak K., Dumnicka P., Drożdż R., Kuśnierz-Cabala B.: Role of new biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. *Folia Med. Cracov.* 2015; 55(4): 21-33.
4. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation.* 2018; Doi: org/10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:  
*udział w opracowaniu manuskryptu, rekrutacji pacjentów, przygotowaniu bazy danych, opracowaniu oraz dyskusji części klinicznej*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w praca przedłożona przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowi jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.

*Agnieszka  
Gala - Błędzińska*  
podpis wnioskodawcy

**Dr hab. n. med. Krzysztof Gil, prof. UJ**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 26. 07. 2018 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.:

Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Disease Markers*. 2016; Doi. org/10.1155/2016/8489543.

oświadczam, że mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

*udział w przygotowaniu piśmiennictwa*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.



(podpis wnioskodawcy)

**Dr n. med. Jakub Kucharz**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 10. 08. 2018 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Cerałowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation*. 2018; Doi: org/10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział w opracowaniu piśmiennictwa oraz pomoc w procesie publikacji pracy*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.



.....  
podpis wnioskodawcy

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. Gala-Błędzińska A., Żyłka A., Rybak K., Dumnicka P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Użyteczność lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilów (NGAL) i wyliczanego wskaźnika NGAL do kreatyniny w moczu jako wczesnych predyktorów uszkodzenia nerek u pacjentów z cukrzycą typu 2. *Diagn. Lab.* 2015; 51(2): 97-104.
2. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Disease Markers.* 2016; Doi: org/10.1155/2016/8489543.
3. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Rybak K., Dumnicka P., Drożdż R., Kuśnierz-Cabala B.: Role of New biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. *Folia Med. Cracov.* 2015; 55(4): 21-33.
4. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation.* 2018; Doi: org/10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział w opracowaniu koncepcji merytorycznej manuskryptu, zaplanowanie i wykonanie badań laboratoryjnych, udział w opracowaniu bazy danych i dyskusja wyników, korekta manuskryptów*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.

*B.Kuśnierz Cabala*

.....  
podpis wnioskodawcy

**Prof. dr hab. n. med. Marek Kuźniewski**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 10. 08. 2018 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. Gala-Błędzińska A., Żyłka A., Rybak K., Dumnicka P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Użyteczność lipokaliny związanej z żelatyną neutrofilów (NGAL) i wyliczanego wskaźnika NGAL do kreatyniny w moczu jako wczesnych predyktorów uszkodzenia nerek u pacjentów z cukrzycą typu 2. *Diagn. Lab.* 2015; 51(2): 97-104.
2. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Disease Markers.* 2016; Doi. org/10.1155/2016/8489543.
3. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Maziarz B., Drożdż R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation.* 2018; doi: org/10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział w opracowaniu koncepcji manuskryptu, interpretacji uzyskanych wyników badań, pomoc w przygotowaniu dyskusji części klinicznej*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.

.....  
  
.....  
Prof. dr hab. n. med. **MAREK KUŹNIEWSKI**  
Specjalista chorób wewnętrznych  
Specjalista nefrolog  
3044363 980607119  
.....  
podpis wnioskodawcy

**Dr n. med. Barbara Maziarz**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 18. 08. 2018 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.:

1. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Drożdż R., Olszanecki R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation*. 2018; doi.org/10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział wykonanie badań laboratoryjnych – oznaczenie białek specyficznych*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w praca przedłożona przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowi jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.



.....  
podpis wnioskodawcy

**Prof. dr hab. n. med. Rafał Olszanecki**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 26. 07. 2018 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Dumnicka P., Ceranowicz P., Kuźniewski M., Gil K., Olszanecki R., Kuśnierz-Cabala B.: Is urinary NGAL determination useful for monitoring kidney function and assessment of cardiovascular disease? A 12-month observation of patients with type 2 diabetes. *Disease Markers*. 2016; Doi. org/10.1155/2016/8489543.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział w przygotowaniu manuskryptu, opracowaniu piśmiennictwa oraz pomoc w procesie publikacji pracy*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.



.....  
podpis wnioskodawcy

**Lek. Katarzyna Rybak**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 02. 10. 2017 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. Gala-Błędzińska A., Żyłka A., Rybak K., Dumnicka P., Kuźniewski M., Kuśnierz-Cabala B.: Użyteczność lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilów (NGAL) i wyliczanego wskaźnika NGAL do kreatyniny w moczu jako wczesnych predyktorów uszkodzenia nerek u pacjentów z cukrzycą typu 2. *Diagn. Lab.* 2015; 51(2): 97-104.
2. Żyłka A., Gala-Błędzińska A., Rybak K., Dumnicka P., Drożdż R., Kuśnierz-Cabala B.: Role of New biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. *Folia Med. Cracov.* 2015; 55(4): 21-33.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział w przygotowaniu manuskryptu oraz dobór piśmiennictwa i korekta opracowania*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w prace przedłożone przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowią jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.

*Katarzyna Rybak*  
.....  
podpis wnioskodawcy

**Dr Anna Ząbek-Adamska**  
(tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Kraków, dn. 10. 08. 2018 r.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.:

1. Żyłka A., Dumnicka P., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błędzińska A., Ceranowicz P., Kucharz J., Ząbek-Adamska A., Drożdż R., Olszański R., Kuźniewski M.: Markers of glomerular and tubular damage in the early stage of chronic kidney disease in diabetic patients. *Mediators of Inflammation*. 2018; doi. org/10.1155/2018/7659243.

oświadczam, że mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to:

*udział wykonanie badań laboratoryjnych – oznaczenie białek specyficznych*

Jednocześnie wyrażam zgodę na uznanie, że w/w praca przedłożona przez lek. Agnieszkę Żyłkę jako część jej rozprawy doktorskiej, stanowi jej indywidualny wkład w rozwój medycyny.



podpis wnioskodawcy

## 8. Wykaz skrótów

<i>Skrót</i>	<i>Nazwa angielska</i>	<i>Nazwa polska</i>
<i>BMI</i>	Body Mass Index	Wskaźnik masy ciała
<i>CKD</i>	Chronic Kidney Disease	Przewlekła choroba nerek
<i>CVD</i>	Cardiovascular Diseases	Choroby układu sercowo-naczyniowego
<i>CRP</i>	C-reactive protein	Białko C-reaktywne
<i>CysC</i>	Cystatin C	Cystatyna C
<i>DKD</i>	Diabetic Kidney Disease	Cukrzycowa choroba nerek
<i>DMt2</i>	Diabetes Mellitus type 2	Cukrzyca typu 2
<i>eGFR</i>	estimated Glomerular Filtration Rate	Szacowana wartość przesączania kłębuszkowego
<i>FSGS</i>	Focal Segmental Glomerulosclerosis	Ogniskowe segmentowe stwardnienie kłębuszków nerkowych
<i>GLP</i>	Glukagon-like peptide-1	Glukagonopodobny peptyd-1
<i>HbA<sub>1c</sub></i>	Glycated Hemoglobin A <sub>1c</sub>	Hemoglobina glikowana A <sub>1c</sub>
<i>IgG</i>	Immunoglobulin G	Immunoglobulina G
<i>IL-18</i>	Interleukin-18	Interleukina-18
<i>KDOQI</i>	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative	
<i>KIM-1</i>	Kidney Injury Molecule-1	Cząsteczka uszkodzenia nerek-1
<i>L-FABP</i>	Liver type fatty acid binding protein	Wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe
<i>mRNAs</i>	microRNAs	mikroRNAs
<i>NAG</i>	N -acetyl-b-D-glucosaminidase	N-acetylo-b-D-glukozaminidaza
<i>NGAL</i>	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	Lipokalina związana z żelatyną neutrofilów
<i>OGTT</i>	Oral Glucose Tolerance Test	Doustny test tolerancji glukozy
<i>ROC</i>	Receiver Operating Characteristic	Krzywa ROC
<i>ROS</i>	Reactive Oxygen Species	Reaktywne formy tlenu
<i>SGLT-2</i>	Sodium glucose cotransporter-2 inhibitors	Inhibitatory kotransportera sodowo-glukozowego 2
<i>uACR</i>	urinary Albumin to Creatinine Ratio	Wskaźnik albumina do kreatyniny w moczu
<i>uNCR</i>	urine Neutrophil gelatinase-associated lipocalin to creatinine ratio	Wskaźnik NGAL do kreatyniny w moczu

## **9. Załącznik nr 1**

### **Kryteria diagnostyczne wykorzystane w pracy doktorskiej:**

#### **I. DMt2 - kryteria rozpoznania:**

Zaleczenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę typu 2 2015. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Clin Diabetol. 2015; 4 (Suppl A): 1-73 [9].

1. Przygodna glikemia  $\geq 11,1 \text{ mmol/l}$  (200 mg/dl) z typowymi objawami cukrzycy (wzmożone pragnienie, wielomocz, osłabienie).
2. 2-krotnie glikemia na czczo  $\geq 7 \text{ mmol/l}$  (126 mg/dl).
3. Glikemia w 120. min po doustnym obciążeniu 75g glukozy (OGTT)  $\geq 11,1 \text{ mmol/l}$  (200 mg/dl).

#### **II. DKD - kryteria rozpoznania:**

Zaleczenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę typu 2 2015. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Clin Diabetol. 2015; 4 (Suppl A): 1-73 [9].

DKD rozpoznaje się u chorego na cukrzycę typu 1 lub 2 po stwierdzeniu albuminurii, w obecności retinopatii cukrzycowej oraz po wykluczeniu innych przyczyn CKD. Zwiększone wydalanie albuminy ( $\text{uACR} > 30 \text{ mg/g}$ ) należy potwierdzić w  $\geq 1$  z 2 dodatkowych badań wykonanych w pierwszej rannej próbce moczu w ciągu następnych 3-6 miesięcy (zwiększona albuminuria potwierdzona w  $\geq 2$  z 3 badań).

### **III. Definicja CKD (wg KDIGO 2012):**

National Kidney Foundation: KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 update. Am J Kidney Dis. 2012; 60: 850-886. doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.07.005 [2].

CKD to utrzymujące się >3 miesiące nieprawidłowości budowy lub czynności nerek, mające znaczenie dla zdrowia.

Celem określenia zaawansowania CKD stosuje się kryteria wielkości GFR oraz wielkości albuminurii.

#### **Kategorie GFR w CKD:**

<i>Kategoria GFR</i>	<i>GFR (ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</i>	<i>Nazwa opisowa</i>
G1	≥90	prawidłowe lub zwiększone GFR
G2	60-89	niewielkie zmniejszenie GFR
G3a	45-59	zmniejszenie GFR między niewielkim a umiarkowanym
G3b	30-44	zmniejszenie GFR między umiarkowanym a ciężkim
G4	15-29	ciężkie zmniejszenie GFR
G5	<15	schyłkowa niewydolność nerek

\*wielkość GFR szacuje się na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy z zastosowaniem wzoru CKD-EPI lub skróconego wzoru MDRD

Kategorie albuminurii w CKD:

<i>Kategoria</i>	<i>Dobowa utrata z moczem (mg/24h)</i>	<i>Wskaźnik albumina/kreatynina (mg/g)</i>
A1	<30	<30
A2	30-300	30-300
A3	>300	>300

\*wielkość albuminurii określa się na podstawie uACR w dowolnej próbce moczu lub dobowej utraty albuminy z moczem

## **10. Streszczenie**

DMt2 należy do chorób przewlekłych, których wczesne rozpoznanie oraz wielokierunkowe leczenie ma na celu zahamowanie progresji zależnych od cukrzycy uszkodzeń narządowych oraz ma wpływ na poprawę rokowania. Na podstawie obowiązującej definicji opracowanej przez KDIGO 2007 [10], rozpoznanie DKD wymaga potwierdzenia albuminurii przy współwystępowaniu zmian o charakterze retinopatii. Biorąc pod uwagę ograniczoną wartość diagnostyczną stosowanych rutynowo metod laboratoryjnych, kluczowym wydaje się poszukiwanie nowych markerów DKD pozwalających na wczesną diagnostykę wyprzedzającą nieodwracalne zmiany zachodzące na poziomie kłębuszków i cewek nerkowych. Wobec heterogenności ścieżek patofizjologicznych prowadzących do nefropatii w przebiegu DMt2 oraz możliwości uszkodzenia się różnych struktur nefronu w środowisku cukrzycowym, celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena wybranych wskaźników pod kątem ich użyteczności w diagnostyce wczesnych stadiów DKD.

Grupę badaną stanowili pacjenci, którzy zakwalifikowani zostali odpowiednio do czterech grup CKD: G1/A1, G1/A2, G2/A1, G2/A2, z których najliczniejsza obejmowała 115 chorych z DMt2. Badania laboratoryjne wykonywano w ramach wizyt kontrolnych w Poradni Nefrologicznej w Klinicznym Szpitalu nr 2 w Rzeszowie. Analiza wyników uzyskanych w toku pracy wykazała, że jednym z najbardziej obiecujących biowskaźników DKD jest NGAL (*lipokalina związana z żelatynazą neutrofilów*) oznaczany zarówno w moczu, jak i w surowicy chorych z DMt2. W pracach oryginalnych Autorki (*Diagn Lab. 2015; 51: 97-104; Dis Markers. 2016; doi.org/10.1155/2016/8489543; Mediat Inflamm. 2018; doi.org/10.1155/2018/7659243*) wykazano użyteczność diagnostyczną uNGAL oraz uNCR w diagnostyce wczesnych stadiów DKD, przedstawiając ich istotną rolę w predykcji CKD G1/G2 A2. Wysoką specyficzność oznaczeń powyższych wskaźników potwierdza ich

dodatnia korelacja z albuminurią oraz uACR (*Diagn Lab.* 2015; 51: 97-104). Wartość uNCR na poziomie 21,3 µg/g pozwala zakwalifikować chorych z DMt2 do grupy zwiększonego ryzyka rozwoju uszkodzenia cewek nerkowych oraz stanowi niezależny czynnik ryzyka CVD. Zaobserwowano, istotny wpływ wielokierunkowego leczenia nefroprotekcyjnego w grupie chorych z DMt2, które poprzez poprawę wyrównania glikemii, wyrażoną wartością HbA<sub>1c</sub>, wpływa istotnie na zmniejszenie białkomoczu związanego z uszkodzeniem cewek nefronu (*Dis Markers.* 2016; doi.org/10.1155/2016/8489543). Zgodnie z wiedzą Autorki, przedstawione w pracy doktorskiej wyniki dotyczące roli oznaczeń uromoduliny w surowicy i moczu oraz wskaźnika uromodulina/kreatynina w moczu u chorych z DMt2, są pierwszym doniesieniem, potwierdzającym użyteczność powyższych oznaczeń w diagnostyce DKD w populacji polskiej. Obserwowane istotne obniżenie stężenia uromoduliny w surowicy u pacjentów z DMt2 mają wartość progностyczną dla prognozowania wczesnego uszkodzenia nerek niezależnie od wartości albuminurii. Ciekawą obserwacją jest wykazanie ujemnej korelacji uromoduliny w moczu oraz wskaźnika uromodulina/kreatynina w moczu z wartością HbA<sub>1c</sub> wskazującej na większą podatność chorych na uszkodzenie cewek nefronu w niedostatecznie wyrównanej DMt2 (*Mediat Inflamm.* 2018; doi.org/10.1155/2018/7659243).

W przedstawionym badaniu wykazano przewagę oznaczeń wartości eGFR z zastosowaniem wzoru opartego na pomiarze stężenia sCysC (eGFR<sub>cys</sub>) w diagnostyce CKD G1/G2 A1-A2 nad rutynowo stosowanymi obliczeniami z wykorzystaniem wartości kreatyniny w surowicy. Powyższa obserwacja pozwala na poszerzenie dostępnych narzędzi diagnostycznych o możliwość wykorzystywania alternatywnej metody szacowania GFR u pacjentów z DMt2 w celu oceny wczesnego uszkodzenia bariery filtracyjnej nefronu. W pracy podkreślono również istotność oznaczeń sCysC w predykcji uszkodzenia kłębuszków nerkowych. Wykorzystanie w rutynowej diagnostyce DKD pomiarów CysC

w surowicy wymaga jednak ustalenia wartości wyjściowych z udziałem większej grupy chorych (*Mediat Inflamm.* 2018; [doi.org/10.1155/2018/7659243](https://doi.org/10.1155/2018/7659243)).

Autorzy badania oceniając uszkodzenie kłębuszków nerkowych w DMt2 potwierdzili, iż obecność w moczu podwyższonych stężeń IgG oraz transferyny, wobec dużej masy cząsteczkowej wskaźników, świadczy o znacznym uszkodzeniu bariery filtracyjnej u pacjentów z umiarkowanie podwyższoną albuminurią. Otrzymane w pracy wyniki oznaczeń IgG oraz transferyny w moczu przekraczały u części pacjentów przyjęte zakresy wartości referencyjnych oraz oszacowane w badaniu punkty odcięcia, co może stanowić potwierdzenie ich wysokiej specyficzności w diagnostyce DKD (*Mediat Inflamm.* 2018; [doi.org/10.1155/2018/7659243](https://doi.org/10.1155/2018/7659243)).

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano przydatność diagnostyczną pomiarów stężeń KIM-1 w moczu oraz wskaźnika KIM-1/kreatynina w moczu w predykcji uszkodzenia cewek proksymalnych we wczesnym stadium CKD towarzyszącym DMt2. Obserwacje są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami. Przedstawiono istotną przewagę oznaczeń KIM-1 skorygowanej ze stężeniem kreatyniny w moczu, podkreślając dominującą rolę KIM-1/kreatynina w moczu oraz IgG w moczu jako najlepszych, spośród badanych biowskaźników - predyktorów DKD (*Mediat Inflamm.* 2018; [doi.org/10.1155/2018/7659243](https://doi.org/10.1155/2018/7659243)).

Istnieją liczne prace potwierdzające, że stosowane leczenie nefroprotekcyjne działa ochronnie głównie na kłębuszki nerek, natomiast wpływ tego leczenia na cewki nefronu pozostaje niejasny. Poczyniona w obecnym badaniu obserwacja stanowi być może zapowiedź zmiany kierunku diagnostyki oraz leczenia części pacjentów z DKD na wczesnych etapach rozwoju tubulopatii związanej z cukrzycą. Zgodnie z aktualną wiedzą, nadzędnym celem opieki nad pacjentem z DMt2 jest utrzymywanie dobrej kontroli metabolicznej choroby. Potwierdzeniem tej tezy jest wykazanie istotnych korelacji większości badanych

biowskaźników z HbA<sub>1c</sub>, co wskazuje na znaczco większą podatność na uszkodzenie struktur nefronu w źle wyrównanej cukrzycy.

## 11. Summary

DMt2 is a chronic disease in which early diagnosis and multidirectional treatment allows the progression of the disease to be slowed down, improving the prognosis and preventing complications. According to the current definition developed by KDIGO 2007 [10], DKD diagnosis is based on confirmed albuminuria with concurrent retinopathic lesions. Considering the limited diagnostic value of the routine laboratory methods, finding new DKD markers seems crucial, as it would enable early diagnosis, prior to the development of irreversible renal glomerular and tubular lesions. Due to the heterogeneity of the pathophysiological pathways resulting in renal impairment in DMt2, and understanding of the mechanisms responsible for nephron damage in diabetes mellitus, the aim of this doctoral thesis was to assess the usefulness of selected parameters in the diagnostics of early DKD stages.

The study population included patients qualified in four groups, without signs of overt proteinuria, with CKD stage: G1/A1, G1/A2, G2/A1, G2/A2. The most numerous group comprised 115 DMt2 patients. Laboratory tests were performed during follow-up visits in the Nephrology Clinic in Hospital No.2 in Rzeszów. The analysis of the study results revealed that one of the most promising DKD biomarkers is NGAL, determined both in urine and in the blood serum of patients with DMt2. The studies (*Diagn Lab.* 2015; 51: 97-104; *Dis Markers.* 2016; [doi.org/10.1155/2016/8489543](https://doi.org/10.1155/2016/8489543); *Mediat Inflamm.* 2018; [doi.org/10.1155/2018/7659243](https://doi.org/10.1155/2018/7659243)) demonstrated the diagnostic usefulness of uNGAL and uNCR in the diagnosis of early DKD stages, and presented their significant role in the prediction of CKD stage G1/G2 A2. The high specificity of determination of the parameters above is confirmed by their positive correlation with albuminuria and uACR (*Diagn Lab.* 2015; 51: 97-104). uNCR value of 21.3 µg/g allows to qualify DMt2 patients to the group of

increased risk of renal tubular damage, and constitutes an independent risk factor for CVD. Considerable impact of the multidirectional nephroprotective treatment was observed in patients with DMt2. The therapy improved glycaemic control, expressed by HbA<sub>1c</sub> value, thus significantly reducing proteinuria associated with the damage of nephron tubules (*Dis Markers.* 2016; [doi.org/10.1155/2016/8489543](https://doi.org/10.1155/2016/8489543)). According to the author's knowledge, the outcomes presented in the thesis regarding the determination of uromodulin in blood serum and urine, as well as the uromodulin/creatinine index in urine in DMt2 patients are the first findings supporting the usefulness of the above parameters in the diagnostics of DKD in the Polish population. The significant reduction of serum uromodulin concentrations in DMt2 patients observed demonstrate a prognostic value in predicting early renal damage, independently of the level albuminuria. The negative correlation between urine uromodulin or urine uromodulin/creatinine index and HbA<sub>1c</sub> value is an important observation. It indicates that the patients with insufficiently controlled DMt2 are more susceptible to damage of the nephron tubules (*Mediat Inflamm.* 2018; [doi.org/10.1155/2018/7659243](https://doi.org/10.1155/2018/7659243)).

The study presented demonstrated that eGFR determination using the formula based on sCysC (eGFR<sub>cys</sub>) concentration is superior to the standard calculations involving serum creatinine values in the diagnostics of CKD stage G1/G2 A1-A2. The conclusion above allows to extend the range of available diagnostic tools to include the alternative method of GFR estimation in DMt2 patients in order to assess early damage of the nephron filtration barrier. The study also emphasises the significance of sCysC determination in the prediction of renal glomerular impairment. However, for CysC measurements to be used in routine diagnostics of DKD, baseline values must be established based on a higher number of patients (*Mediat Inflamm.* 2018; [doi.org/10.1155/2018/7659243](https://doi.org/10.1155/2018/7659243)).

Assessing the renal glomerular impairment in DMt2, the study authors confirmed that elevated IgG and transferrin concentrations in urine, considering the high molecular weights

of these markers, is indicative of significant damage of the filtration barrier in patients with moderately increased albuminuria. The urine IgG and transferrin values observed in some study patients exceeded the reference range and the cut-off values estimated in the study, which confirms their high specificity for DKD diagnostics (*Mediat Inflamm.* 2018; [doi.org/10.1155/2018/7659243](https://doi.org/10.1155/2018/7659243)).

The tests conducted demonstrated the diagnostic usefulness of urine KIM-1 concentrations and urine KIM-1/creatinine index for the prediction of proximal tubular impairment in early stages of CKD associated with DMt2. These findings are consistent with previous reports. A significant superiority of KIM-1 adjusted to urine creatinine concentration is demonstrated, emphasizing the dominant role of urine KIM-1/creatinine and urine IgG as the best predictors of DKD among the studied biomarkers (*Mediat Inflamm.* 2018; [doi.org/10.1155/2018/7659243](https://doi.org/10.1155/2018/7659243)).

The commonly applied nephroprotective treatment primarily affects renal glomerules, leaving nephron tubules prone to damage. The presented finding forecasts a change in the diagnostics and treatment of patients with early-stage DKD. According to the present state of knowledge, the primary aim in the management of DMt2 patients is to maintain a good metabolic control of the disease. This thesis is confirmed by the significant correlations presented between the studied biomarkers and HbA<sub>1c</sub>, which demonstrates a considerably higher susceptibility to damage of the nephron structures in uncontrolled diabetes.