

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ, МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА ПО НЕФРОЛОГИЯ**

**УМБАЛ „ЦАРИЦА ЙОАННА-ИСУЛ“ ЕАД, СОФИЯ**

**КЛИНИКА ПО НЕФРОЛОГИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд

на тема

**МОРФОЛОГИЧНИ И ЛАБОРАТОРНИ  
ОСОБЕНОСТИ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС  
ЗАХАРЕН ДИАБЕТ И ХРОНИЧНО  
БЪБРЕЧНО ЗАБОЛЯВАНЕ**

за

придобиване на образователна и научна степен „доктор“

на

**д-р Биляна Димитрова Василева**

Научен ръководител: доц. д-р Валентин Лазаров, дм.

Научен консултант: проф. д-р Румяна Миронова

**София, 2020**

Дисертацията е написана върху 162 стандартни страници.  
Онагледена е със 54 фигури и 13 таблици.  
Използвани са 179 литературни източника, от които 3 на кирилица и 176 на латиница.

Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за официална защита на редовно заседание на Катедра по нефрология на Медицински факултет на МУ-София.

Официалната защита на дисертационния труд ще се проведе на 12.02.2020г. от 12:00 часа в Аудитория „Професор Янко Добрев“ УМБАЛ „Александровска“ – бул. „Свети Георги Софийски“ № 1 пред утвърдено със Заповед на Ректора на МУ – София № РК 36-2873/27.12.2019г. научно жури в състав:

1. Проф. д-р Емил Паскалев Димитров, д.м.н. – вътрешен член за МУ – София, Катедра по нефрология на Медицински факултет при МУ-София.
2. Проф. д-р Боряна Петрова Делийска, д.м.н. - вътрешен член за МУ – София, Катедра по нефрология на Медицински факултет при МУ-София.
3. Доц. д-р Светла Василева Стайкова, д.м. - външен член за МУ – София, Медицински университет – Варна.
4. Проф. д-р Валентина Христова Маджова, д.м. - външен член за МУ – София, Медицински университет – Варна.
5. Проф. д-р Васил Величков Тодоров, д.м.н. – външен член за МУ – София, Медицински университет – Плевен

Резервни членове:

Проф. Райна Теодосиева Робева – вътрешен резервен член за МУ-София

## Съдържание:

Използвани съкращения.....	4
I. Увод.....	5
II. Цел и задачи .....	6
III. Материал и методи.....	7
1. Материал и методи I .....	7
2. Материал и методи II .....	15
IV. Резултати.....	24
1. Анализ на честота и типът на морфологичните изменения при пациенти със ЗД, които са имали показания за провеждане на пункционна бъбречна биопсия .....	24
2. Анализ на основните клинични и лабораторни показатели при пациентите с хистологични данни за НДБЗ, хистологични данни за ДН и при тези с комбинирана патология .....	27
3. Анализ на серумните и уринните нива на продуктите на неензимно гликиране и антителата насочени срещу AGEs при пациенти с диабет и контроли .....	36
4. Анализ на връзката на серумните и уринните нива на продуктите на гликиране и антителата насочени срещу AGEs с основните клинични и лабораторни показатели при пациенти със ЗД и ХБЗ .....	40
5. Определяне значимостта на продуктите на неензимното гликиране и антителата, насочени срещу AGEs като неинвазивен диагностичен маркер за диабетна нефропатия .....	47
V. Дискусия.....	50
VI. Обобщени основни изводи.....	57
VII. Основни приноси на дисертационния труд.....	58
VIII. Списък на публикациите във връзка с темата на дисертационния труд.....	59

## **Използвани съкращения:**

ЗД - Захарен диабет

ЗД тип 1 – Захарен диабет тип 1

ЗД тип 2 – Захарен диабет тип 2

ДББ – Диабетна бъбречна болест

ДН – диабетна нефропатия

НДБП – недиабетни бъбречни промени

НДБЗ – недиабетно бъбречно заболяване

ПББ – пункционна бъбречна биопсия

СЗО – Световна здравна организация

ТБН – Терминална бъбречна недостатъчност

ХБЗ – Хронично бъбречно заболяване

ФА – фруктозамин

AGEs – продукти на напредналото гликиране

Anti-AGEs – антитела срещу напредналите продукти на гликиране

N-(ε)-CML – N-(ε) –карбосиметил лизин

HbA1c – гликиран хемоглобин

## I. Увод:

Захарният диабет (ЗД) е метаболитно заболяване, характеризиращо се с хипергликемия, причинено от дефекти в инсулиновата секреция, инсулиново действие или и двете. Хроничната хипергликемия в хода на ЗД е свързана с дълготрайни увреждания, дисфункция и недостатъчност на различни органи - очи, бъбреци, нерви, сърце и кръвоносни съдове.

Едно от основните микроангиопатични усложнения на ЗД е диабетната нефропатия (ДН). В световен мащаб тя е водеща причина за хронично бъбречно заболяване (ХБЗ). Около 43% от всички пациенти провеждащи хемодиализно лечение са диабетици.

Патогенезата на ДН е сложна и многофакторна и включва различни хипергликемично-индуцирани механизми, като например взаимодействие между метаболитни и хемодинамични промени, както и генетична предрасположеност, която поставя етапа на бъбречното увреждане.

Най-важният патогенетичен механизъм е неензимното гликиране на белтъците. В условия на хипергликемия, глюкозата влиза в неензимно взаимодействие с белтъците с кратък полуживот, в резултат на което се образуват продуктите на напредналото гликиране (AGEs). Те са стабилни съединения и са причина за трайни и необратими изменения в структурата и функцията на аминок-биомолекулите. Производството на AGEs се осъществява при нормалния процес на стареене, но е установено, че натрупването му е по-бързо при пациенти със ЗД и влошена бъбречна функция. Повишените серумни нива на AGEs са свързани с усложнения на ЗД и предсказват риска от прогресия на микроваскуларните усложнения, които водят до инвалидизиране на пациентите.

Освен това данните от проучвания през последните години установяват, че ДН не е единствената причина за ХБЗ при диабетниците. Нараства честотата на недиабетното бъбречно заболяване (НДБЗ) сред пациентите със ЗД. Хистологичните бъбречни промени трудно могат да се определят само по клинични и лабораторни данни. Разграничаването на бъбречната патология при ЗД може да се постави само чрез пункционна бъбречна биопсия (ПББ). При диабетниците тя не се провежда рутинно, като се препоръчва само при пациенти с очаквани недиабетни бъбречни промени.

Ранното отдиференциране на ДН от недиабетни бъбречни изменения е от особено значение за хода на ХБЗ, тъй като последните се лекуват активно и подобряват прогнозата на пациента по отношение на бъбречната преживяемост. AGEs могат да бъдат полезни неинвазивни биомаркери за ранно диагностициране на ДН, а последващото инхибиране на тяхното образуване е опит за терапевтично ѝ повлияване.

## **II. Цел и задачи:**

**Цел: да се изяснят морфологичните и лабораторните особености при пациенти със захарен диабет и хронично бъбречно заболяване**

За изпълнение на дефинираната цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се определи честота и типът на морфологичните изменения при пациенти със ЗД, които са имали показания за провеждане на пункционна бъбречна биопсия

2. Да се анализират и съпоставят основните клинични и лабораторни показатели при пациентите с хистологични данни за НДБЗ, хистологични данни за ДН и при тези с комбинирана патология.

3. Да се съпоставят серумните и уринните нива на продуктите на неензимно гликиране и антителата насочени срещу AGEs при пациенти с диабет и контроли.

4. Да се съпоставят серумните и уринните нива на продуктите на гликиране и антителата насочени срещу AGEs с основните клинични и лабораторни показатели при пациенти със ЗД и ХБЗ.

5. Да се определи значимостта на продуктите на неензимното гликиране и антителата, насочени срещу AGEs като неинвазивен диагностичен маркер за диабетна нефропатия.

### **III. Материал и методи:**

#### **1. Материал:**

##### **Пациенти:**

1. Проведено е ретроспективно проучване на 565 биопсирани пациенти, хоспитализирани в Клиниката по Нефрология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ” гр. София за периода 01.01.2012 г. до 30.05.2019 г. От тях 63 са със Захарен диабет, диагностициран преди провеждането на ПББ.

2. Индикациите за провеждане на бъбречна биопсия при диабетичите са клинично предполагаемо НДБЗ и се основават на препоръките на KDOQI за състояния при които трябва да се изключи недиабетно увреждане на бъбреците – липса на ретинопатия, бързо влошаване на бъбречната функция, увеличаване на протеинурията за кратък период или поява на нефрозен синдром, наличие на патологично активен уринен седимент, както и белези на системно заболяване.

При пациентите са проведени стандартни клинични, клинико-лабораторни и хистологични изследвания. След анализиране на резултатите от ПББ, пациентите са разделени на три групи: 1гр. – пациенти с хистологични данни за НДБЗ; 2гр. – пациенти с хистологични данни за НДБЗ, насложено върху ДН; 3гр. – пациенти с хистологични изменения, както при ДН. Съпоставени са основните демографски, клинични и лабораторни показатели, както и морфологичните изменения на тези групи.

Прилагани са следните включващи критерии по отношение на пациентите:

1. Декларирано писмено информирано съгласие от страна на пациента за провеждане на ПББ.
2. Възраст над 18г.
3. Диагностициран ЗД.

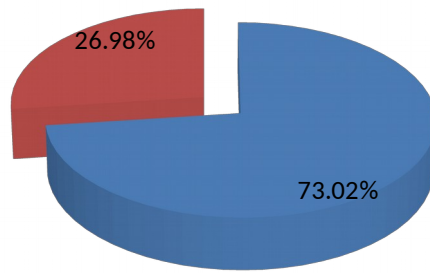
Прилагани са следните изключващи критерии по отношение на пациентите:

1. Несъгласие за провеждане на ПББ.
2. Възраст под 18г.
3. Кортикоиндуциран ЗД.

##### **Полово възрастова структура на изследваната група пациенти:**

1.1. Разпределение по пол на изследваната група пациенти:

В проучването са включени 46 (73,0% ) мъже и 17 (27,0%) жени (фиг.1.)



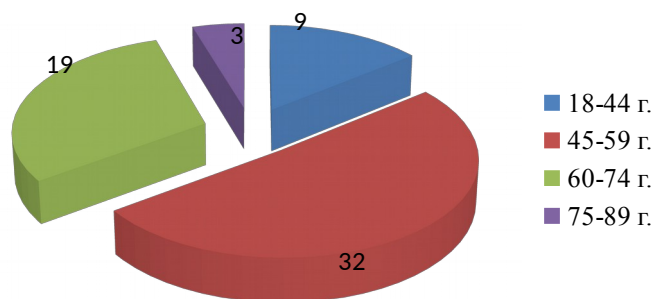
**Фиг. 1.** *Разпределение на пациентите според пола*

1.2. Разпределение по възраст на изследваната група пациенти:

Проучваните пациенти са на средна възраст  $55,75 \pm 10,59$  (от 26 до 81) години, като статистическото разпределение на възрастта е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов,  $p > 0,1$ ).

Средна възраст при мъжете е  $54,76 \pm 10,96$  (от 26 до 81) години, като статистическото разпределение на възрастта в групата на мъжете е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов,  $p = 0,0534$ ). Средна възраст при жените е  $58,41 \pm 9,29$  (от 42 до 72) години, като статистическото разпределение на възрастта в групата на жените е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов,  $p > 0,1$ ). Няма статистически значима разлика между възрастта при мъжете и тази при жените ( $p = 0,2274$ ).

Според възрастовото разпределение по СЗО, в млада възраст (от 18 до 44 години) са 9 пациенти (14,3%), в средна възраст (от 45 до 59 години) са 32 пациенти (50,7%); възрастни (от 60 до 74 години) са 19 пациенти (30,2%); старческа възраст (от 75 до 89 години) са 3 пациенти (4,8%) (фиг.2).



**Фиг. 2.** *Разпространение на пациентите във възрастови групи според СЗО*

**Давност на захарният диабет при проучваната група:**

Давността на ЗД е определена за всеки пациент по анамнеза и по данни от медицинската документация. Средната давност на ЗД сред проучваните пациенти е  $79,62 \pm 117,87$  (от 0 до 840 месеца). При мъжете средната давност на ЗД е  $85,57 \pm 131,10$  (от 0 до 840) месеца, а при жените -  $63,53 \pm 73,27$  (от 1 до 240) месеца.

## **2. Методи:**

### **2.1 . Клинични изследвания:**

Клиничните изследвания включват подробна анамнеза и обективен физикален статус при първата хоспитализацията на пациента в Клиниката.

### **2.2. Антропометрични методи**

Измерване на артериалното налягане при стандартни условия: артериалното кръвно налягане е измерено след период на покой, на нивото на мишницата, в седнало положение. Средата на мишницата е на нивото на сърцето, гърбът е подпрян и краката са плътно на пода. За артериална хипертония се определя състоянието, когато кръвното налягане е постоянно над 140/90 mmHg и/или е налице прием на антихипертензивни медикаменти.

### **2.3. Стандартни лабораторни изследвания:**

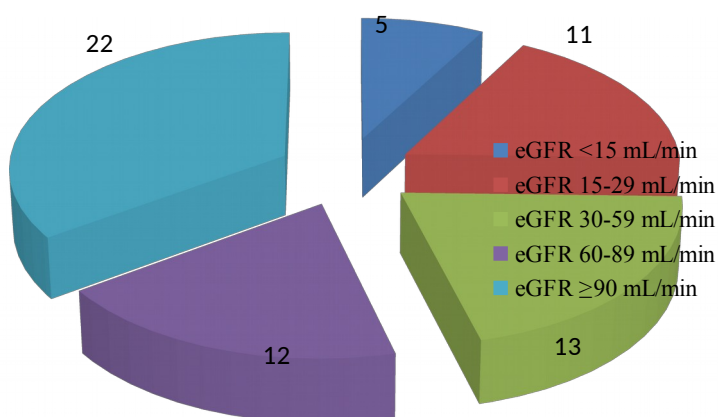
Лабораторните изследвания при пациентите със ЗД диабет са извършени в Отделение по Клинична лаборатория на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ и включват: пълна кръвна картина (ПКК) (еритроцити, хемоглобин, левкоцити, диференциално броене на левкоцити, тромбоцити), биохимични изследвания (креатинин, урея, пикочна киселина, общ белтък, серумен албумин, аспартат аминотрансфераза (ASAT), аланин аминотрансфераза (ALAT), гама-глутамил трансептидаза (GGT), алкална фосфатаза (AP), кръвна захар, общ холестерол, триглицериди, С-реактивен протеин, тотален желязо-свързващ капацитет на плазмата (ТЖСК), изследвания на електролити и киселинно-алкално състояние на кръвта (калий, натрий, хлор, калций, фосфор, серумно желязо). Лабораторното изследване на урина включва: общо химическо изследване на урина (ОХИ) (с тест лента), в това число качествено определяне на белтък в урина, количествено определяне на белтък в урината – прясна и 24-часова урина, микроскопско изследване на уринен седимент. Скоростта на гломерулната филтрация (eGFR) е изчислявана по формулата MDRD въз основа на концентрацията на серумния креатинин. Всички резултати са представени като стойности в мерни единици в системата SI.

Стадирането на ХБЗ, според препоръките на KDIGO-2012г., се различават от тези, публикувани през 2002 г. от KDOQI и са както следва: (табл.1).

**Табл. 1. Стадиране на ХБЗ според eGFR**

eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )		
<b>G1</b>	над 90	нормална или висока
<b>G2</b>	60-89	леко намалена
<b>G3a</b>	45-59	леко до умерено намалена
<b>G3b</b>	30-44	умерено до силно намалена
<b>G4</b>	15-29	силно намалена
<b>G5</b>	<15	бъбречна недостатъчност

В зависимостта от стойността на изчислената eGFR, проучваните пациенти бяха разделени на следните групи: 22 пациенти (35,0%) в групата с eGFR  $\geq$  90 mL/min; 12 пациенти (19,0%) в групата с eGFR от 60 до 89 mL/min; 13 пациенти (21,0%) в групата с eGFR от 30 до 59 mL/min; 11 пациенти (17,0%) в групата с eGFR от 15 до 29 mL/min и 5 пациенти (8,0%) в групата с eGFR < 15 mL/min. (фиг.3).



**Фиг. 3** Разпределение на пациентите според стойностите на eGFR

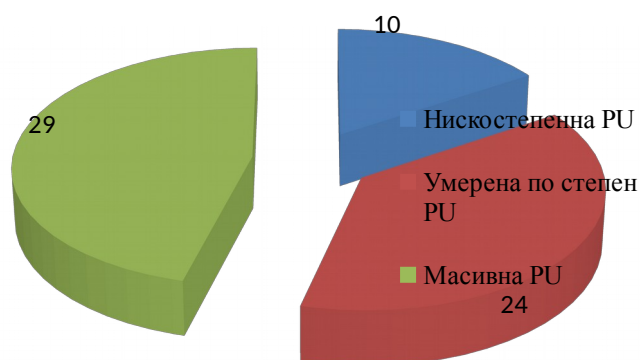
**Табл. 2. Стадиране на ХБЗ според албуминурията (K/DIGO)**

Степени на албуминурия при ХБЗ според K/DIGO-2012				
Албуминурия		Съотношение албумин/креатинин в урината		
Категория	(mg/24ч.)	ACR (mg/mmol)	PCR (mg/g)	
<b>A1</b>	под 30	под 3	под 30	нормално или леко повишена
<b>A2</b>	30-300	3-30	30-300	умерено повишена
<b>A3</b>	над 300	над 30	над 300	значително повишена

Количественото определяне на протеинурията се осъществяване чрез измерване на количеството отделен белтък в урина за 24 часа. В зависимост от стойностите му тя бива:

- физиологична протеинурия - при стойности до 0,15g/24 часа
- нискостепенна протеинурия - от 0,15 до 0,50 g/24 часа,
- умерена по степен протеинурия – от 0,5 до 3,5 g/24 часа
- значителна протеинурия - над 3,5 g/24 часа.

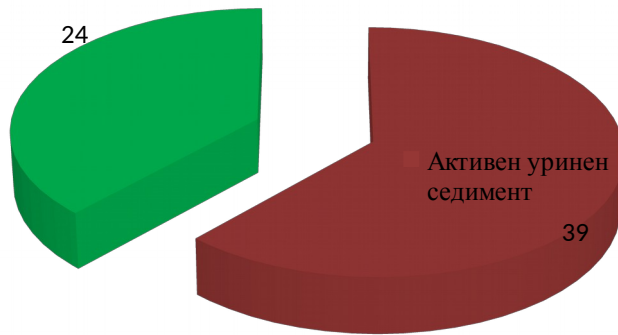
В зависимостта от стойността на протеинурията проучваните пациенти бяха разделени в следните групи: с нискостепенна протеинурия (от 0,15 до 0,5 g/d) са 10 пациенти (15,9%); с умерена по степен протеинурия (от 0,5 до 3,5 g/d) са 24 пациенти (38,1%) и с масивна по степен протеинурия (над 3,5 g/d) са 29 пациенти (46,0%) (фиг. 4).



**Фиг. 4.** Разпределение на пациентите според протеинурията

Наличието на патологично активен уринен седимент се диагностицира чрез микроскопски анализ на седимента на нецентрифугирана урина, като хематурия се дефинира като присъствие на >5 еритроцита на поле при голямо увеличение.

Пациентите с патологично активен уринен седимент са 39 (61,9%), докато тези при които не се установяват патологични отклонения в уринния седимент са 24 (38,1%) (фиг. 5).



**Фиг. 5.** *Разпределение на пациентите според наличието или липсата на активен уринен седимент*

#### **2.4. Хистоморфологични изследвания:**

Всички хистологични материали от пункционните бъбречни биопсии са обработени и диагностицирани от нефропатолога доц. д-р Виолина Минкова, дм. в отделение по Патологична анатомия на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ и Имуноморфологичната лаборатория на Катедра по патологична анатомия на Медицински университет, гр. София.

Обработката на хистологичните материали за светлинномикроскопското изследване (СМ) включва оцветяване с хематоксилин-еозин (HE), с трихром по Masson, с перйодна киселина – Schiff (PAS), сребърна импеграция по Wilder.

Обработката на хистологичните материали за имунофлуоресцентното изследване (ИФ) включва инкубация на хистологичния материал със свързани с флуорохроми моноспецифични античовешки Ig G срещу Ig G, Ig M, Ig A, C1, C3, C4.

Хистологичното диагностициране и класифициране на лезиите при диабетици се основава на разработената от Terzaert и сътр, през 2010г. консенсусна класификация на ДН. Според тежестта на лезиите ДН се класифицира в 4 класа:

- Клас I: Задебеляване на ГБМ

Той се характеризира с нормална находка или минимални промени на светлинна микроскопия и задебеляване на ГБМ на електронна микроскопия (при мъже средно по-дебела от 430 nm, а при жени средно по-дебели от 395 nm.).

- Клас II: мезангиално разширение, леко (IIa) или тежко (IIb).

Разликата между леката и тежка мезангиална експанзия се основава на това дали разширената мезангиална област е по-малка или по-голяма от средната площ на капилярния лумен. Ако се наблюдава тежка мезангиална експанзия, която обхваща повече от 25% от общия мезангиум, патоморфологичните изменения от биопсията се причисляват към клас IIb. Ако мезангиалното разширение се наблюдава при по-малко от 25% от общия мезангиум, биопсията

се класифицира като Па. Морфологичните изменения в този клас съответстват на термина "дифузна диабетна гломерулосклероза".

-Клас III: нодуларна склероза (лезии на Kimmelsteil-Willson)

Този клас се характеризира с наличието на поне една нодуларна лезия (лезия на Kimmelsteil-Wilson), при условие че не съществува повече от 50% от склерозираниите гломерули.

-Клас IV или напреднала диабетна гломерулосклероза

При този клас е налице повече от 50% склерозирани гломерули в патоморфологичния материал.

Диагностицирането на други специфични бъбречно-хистопатологични находки, различни от характерните за ДН се определят като НДБЗ.

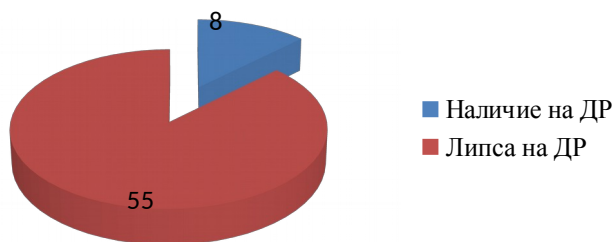
Изменения като хипертрофия на мезангиалният матрикс, мезангиоклетъчна пролиферация, интерстициална инфилтрация и интерстициална фиброза са категоризирани полуколичествено, като липсва на такива е отчитана с 0, леката степен на изразеност като 1, умерена степен на изразеност като 2 и силна степен на изразеност като 3.

Отчетени бяха наличие на склерозираниите гломерули, наличие на полулуния, задебеляване на гломерулната базална мембрана, тубулни изменения, включващи тубулна дистрофия и атрофия, както и наличие на фиброза и хиалиноза в достъпните за изследване съдове.

## **2.5. Други клинични методи:**

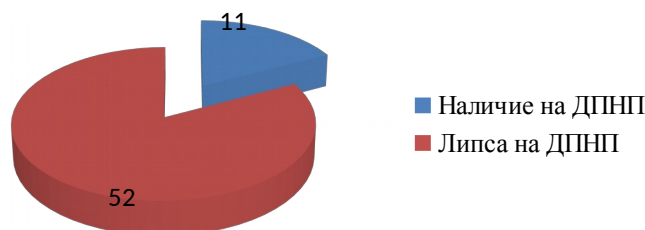
При всички биопсирани пациенти със ЗД е провеждан скрининг за диабетна ретинопатия чрез провеждане на офталмоскопия. Диагностицирането на ДР се осъществява съгласно Международните клинични препоръки за ДР, издадени от Международната конференция по офталмология. Резултатите са определени като липса на очевидна ретинопатия, непролиферативна диабетна ретинопатия и пролиферативна диабетна ретинопатия.

При 55 от проучените пациенти (87,3%) липсва диабетна ретинопатия, докато такава е налице при 8 пациенти (12,7%) (фиг. 6).



**Фиг. 6.** *Разпределение на пациентите според наличието или липсата на ретинопатия:*

При проучваните пациенти е провеждана консултация с невролог и ЕМГ за диагностициране на диабетна полиневропатия. При 52 от пациентите (82,6%) липсва диабетна полиневропатия, докато такава е налице при 11 пациенти (17,4%) (фиг. 7).



**Фиг. 7.** *Разпределение на пациентите според наличието или липсата на диабетна полиневропатия*

При всички биопсирани пациенти със ЗД е провеждана ехография на отделителна система. Според състоянието и съгласно възникналите показания са провеждани и различни рентгенологични, компютъртомографски, допълнителни лабораторни, микробиологични, имунологични, патоморфологични изследвания, както и консултации с други специалисти.

При наличие на клинични, лабораторни, имунологични и хистологични данни за недиабетно бъбречно заболяване самостоятелно или насложено върху диабетната нефропатия в зависимост от вида му е провеждано имунопатогенетично лечение с различна давност с

приложение на кортикостероиди (methylprednisolone, prednisolone, prednisone), cyclophosphamide, azathioprine, mycophenolate mofetil, cyclosporine A, интравенозен имуноглобулин (IVIg). Провеждано е и антикоагулантно лечение, както и антихипертензивно, нефропротективно, гастропротективно, антиагрегантно, уриноинхибиращо, антилипемично, антиинфекциозно, антианемично, корекция на измененията в киселинно-алкалния и водно-електролитния статус на организма, лечение на вторичния хиперпаратиреоидизъм и минералното костно бъбречно заболяване, както и терапия на съпътстващите заболявания, където това е показано.

## **2.6 Дизайн на изследването:**

Проведено е ретроспективно едноцентрово кроссекционно проучване, включващо биоспирани пациентити с диагностициран захарен диабет, преди провеждане на ПББ. В зависимост от хистологичния резултат пациентите са разделени на три групи: 1гр. - с НДБЗ; 2 гр. - НДБЗ в комбинация с ДН; 3 гр. – със самостоятелна ДН. Сравнени са демографските характеристика, лабораторните и морфологични находки при тези групи.

## **2.7. Статистически методи за обработка на резултатите:**

Данните са въведени и обработени със софтуерни пакети Microsoft Excel<sup>®</sup>, 2007 и GraphPad Prism<sup>®</sup>, ver.5.00.

За представяне и оценка на достоверността на получените резултати са прилагани следните статистически методи: дискриптивен анализ с представяне на количествени параметри като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение (SD) или диапазон от стойности в зависимост от вида на честотното разпределение; непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов за проверка типа на честотното разпределение; кростабулация с метода  $\chi^2$  и екзактен тест на Fisher за проверка на хипотези за връзка между категорийни признаци; непараметричен тест на Mann-Whitney за проверка на хипотези за различие между две независими извадки; непараметричен рангов тест на Wilcoxon за проверка на хипотези за различие между две зависими извадки; One-way ANOVA за сравняване на повече от две извадки с множествен сравнителен пост-тест на Bonferroni; корелационен анализ; линеен регресионен анализ; графично и таблично представяне на получените резултати.

Получените резултати приехме като статистически достоверни при прагово ниво на значимост на  $p < 0.05$ .

# **II. 1. Материал**

## **1.1. Пациенти**

В проучването са включени 23 пациенти с диагностициран Захарен диабет, които са били хоспитализирани в Клиниката по Нефрология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ в периода от месец октомври 2016 г. до месец май 2017 г. При пациентите са проведени стандартни клинични и клинично-лабораторни изследвания, като са заделени и проби от кръвни плазми и урина – прясна и 24-часова (съхранявани при температура от -20°C) за определяне на ранните и напреднали продукти на гликиране, както и антителата насочени срещу продукти на напредналото гликиране.

Прилагани са следните включващи критерии по отношение на пациентите:

1. Декларирано писмено информирано съгласие на пациента за включване в проучването.
2. Възраст над 18г.
3. Диагностициран ЗД.

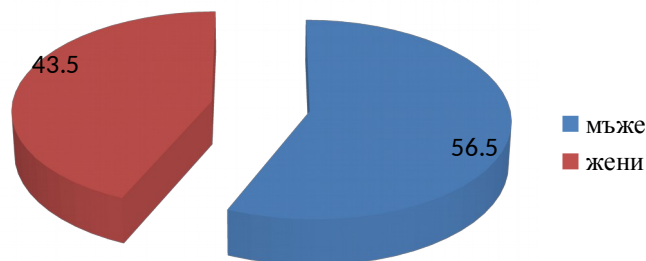
Прилагани са следните изключващи критерии по отношение на пациентите:

1. Нежелание за участие в изследването
4. Възраст под 18г.
5. Кортикоиндуциран ЗД.

#### **1.1.1. Полово възрастова структура на изследваната група пациенти**

1.1.1.1. Разпределение по пол на изследваната група пациенти:

В проучването са включени 13 (56,5% ) мъже и 10 (43,5%) жени (фиг. 8.)

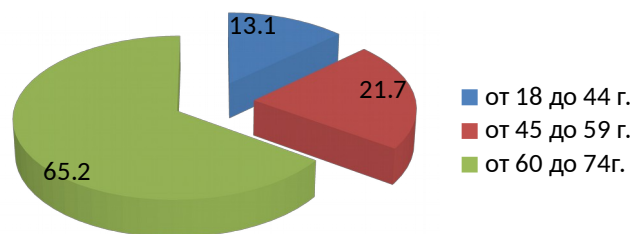


**Фиг. 8.** *Разпределение на пациентите според пола*

1.1.1.2. Разпределение по възраст на изследваната група пациенти:

Проучваните пациенти са на средна възраст  $60,26 \pm 10,14$  (от 39 до 71) години, като честотното разпределение на възрастта при тези пациентите със ЗД, изследвани не е правилно (тест на Колмогоров-Смирнов,  $p=0.0071$ ). Средната възраст при мъжете е  $59,08 \pm 8,74$  (от 39 до 70) години, а при жените е  $61,80 \pm 12,04$  (от 42 до 71) години.

Според възрастовото разпределение по СЗО, в млада възраст (от 18 до 44 години) са 3 пациенти (13,1%), в средна възраст (от 45 до 59 години) са 5 пациенти (21,7%); възрастни (от 60 до 74 години) са 15 пациенти (62,2%); в старческа възраст (от 75 до 89 години) няма пациенти (0%) (фиг. 9).



**Фиг. 9.** Разпространение на пациентите във възрастови групи според СЗО

#### 1.1.2. Давност на Захарния диабет:

Давността на ЗД е определена за всеки пациент по анамнеза и по данни от медицинската документация. Средната давност на ЗД сред проучваните пациенти е  $120,52 \pm 103,32$  (от 12 до 480 месеца). При мъжете средната давност на ЗД е  $96,92 \pm 65,08$  (от 12 до 204) месеца, а при жените -  $151,2 \pm 136,38$  (от 36 до 480) месеца.

#### 1.2. Контролна група пациенти:

С оглед определяне на референтните нива на ранните и напредналите продукти на гликиране и антителата, насочени срещу тях AGEs бяха изследвани 21 недиабетици, пролежали в Клиниката по Нефрология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ за същия период от време. Заделяни са проби от кръвни плазми и урина в хода на стандартните клинично-лабораторни изследвания при всеки един от пациентите и са съхранявани при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Разпределението по пол на контролната група е 12 (57,1%) мъже и 9 (42,9%) жени. Средната възраст на тези пациенти е  $48,57 \pm 10,69$  (от 27 до 63) години. Средната възраст на контролната група мъже е  $49,25 \pm 9,22$ , а средната възраст на контролната група жени е  $47,67 \pm 12,93$ .

## 2. Методи:

### 2.1. Клинични изследвания:

Клиничните изследвания включват подробна анамнеза и обективен физикален статус при хоспитализацията на пациента в Клиниката.

### 2.2. Антропометрични методи

Измерване на артериалното налягане при стандартни условия: артериалното кръвно налягане е измерено след период на покой, на нивото на мишницата, в седнало положение. Средата на мишницата е на нивото на сърцето, гърбът е подпрян и краката са плътно на пода. За артериална хипертония се определя състоянието, когато кръвното налягане е постоянно над 140/90 mmHg и/или е налице прием на антихипертензивни медикаменти.

### 2.3. Стандартни лабораторни изследвания:

Лабораторните изследвания при пациентите със ЗД диабет са извършени в Отделение по Клинична лаборатория на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ и включват: пълна кръвна картина (ПКК) (еритроцити, хемоглобин, левкоцити, дифференциално броене на левкоцити, тромбоцити), биохимични изследвания (креатинин, урея, пикочна киселина, общ белтък, серумен албумин, аспартат аминотрансфераза (ASAT), аланин аминотрансфераза (ALAT), гама-глутамил транспептидаза (GGT), алкална фосфатаза (AP), кръвна захар, общ холестерол, триглицериди, С-реактивен протеин, тотален желязо-свързващ капацитет на плазмата (ТЖСК), изследвания на електролити и киселинно-алкално състояние на кръвта (калий, натрий, хлор, калций, фосфор, серумно желязо). Лабораторното изследване на урина включва: общо химическо изследване на урина (ОХИ) (с тест лента), в това число качествено определяне на белтък в урина, количествено определяне на белтък в урината – прясна и 24-часова урина, микроскопско изследване на уринен седимент. Скоростта на гломерулната филтрация (eGFR) е изчислявана по формулата MDRD въз основа на концентрацията на серумния креатинин. Всички резултати са представени като стойности в мерни единици в системата SI.

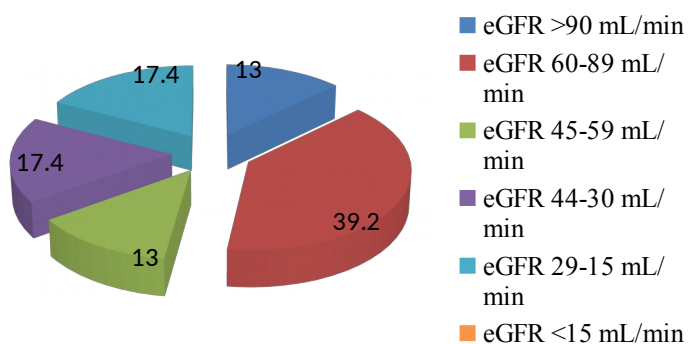
Стадирането на ХБЗ, според препоръките на KDIGO-2012г., се различават от тези, публикувани през 2002 г. от KDOQI и са както следва: (табл.3).

**Табл. 3. Стадиране на ХБЗ според eGFR**

eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )		
<b>G1</b>	над 90	нормална или висока
<b>G2</b>	60-89	леко намалена
<b>G3a</b>	45-59	леко до умерено намалена

<b>G3b</b>	30-44	умерено до силно намалена
<b>G4</b>	15-29	силно намалена
<b>G5</b>	<15	бъбречна недостатъчност

В зависимостта от стойността на изчислената eGFR, проучваните пациенти бяха разделени на следните групи: 3 пациенти (13,0%) в групата с eGFR  $\geq$  90 mL/min; 9 пациенти (39,2%) в групата с eGFR от 60 до 89 mL/min; 7 пациенти (30,4%) в групата с eGFR от 30 до 59 mL/min; 4 пациенти (17,4%) в групата с eGFR от 15 до 29 mL/min и 0 пациенти (0%) в групата с eGFR <15 mL/min. (фиг.10).



**Фиг. 10.** Разпределение на пациентите със ЗД според стойностите на eGFR

**Табл. 4.** Стадиране на ХБЗ според албуминурията (K/DIGO)

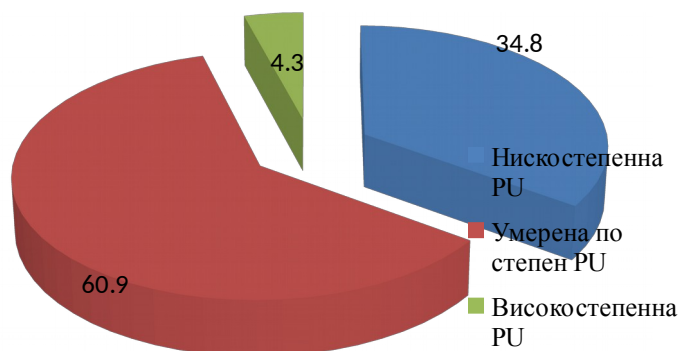
Степени на албуминурия при ХБЗ според K/DIGO-2012				
Албуминурия		Съотношение албумин/креатинин в урината		
Категория	(mg/24ч.)	ACR (mg/mmol)	PCR (mg/g)	
<b>A1</b>	под 30	под 3	под 30	нормално или леко повишена
<b>A2</b>	30-300	3-30	30-300	умерено повишена
<b>A3</b>	над 300	над 30	над 300	значително повишена

Количественото определяне на протеинурията се осъществяване чрез измерване на количеството отделен белтък в урина за 24 часа. В зависимост от стойностите му тя бива:

- физиологична протеинурия - при стойности до 0,15g/24 часа
- нискостепенна протеинурия - от 0,15 до 0,50g/24 часа,

- умерена по степен протеинурия – от 0,5 до 3,5 g/24 часа
- значителна протеинурия - над 3,5 g/24 часа.

Взависимост от стойността на протеинурията проучваните пациенти бяха разделени в следните групи: с нискостепенна протеинурия (от 0,15 до 0,5 g/d) са 8 пациенти (34,8%); с умерена по степен протеинурия (от 0,5 до 3,5 g/d) са 14 пациенти (60,9%) и с масивна по степен протеинурия (над 3,5 g/d) е 1 пациент (4,3%) (фиг.11).



**Фиг. 11.** Разпределение на пациентите със ЗД според протеинурията

#### **2.4. Количествено определяне на нивата на продукти на гликиране и антителата срещу AGEs**

Продуктите на неензимно гликиране на белтъците и антителата насочени срещу AGEs при пациентите със ЗД и при контролната група доброволци са определяни с ELISA по унифицирани методики в Секция регулация на генната активност на институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“ - Българска академия на науките.

##### **2.4.1. Конкуrentна ELISA за количествено определяне на N-(ε)-CML и имидазолон**

В PVC плаките за ELISA се накапват по 100 µl/ямка AGE-BSA разреден в 50 mM карбонатен буфер (pH 9,6) до концентрация 10 µg/ml (за анти-CML антитялото) или 1 µg/ml (за анти-имидазолоновото антитяло) и се инкубира една нощ на 37°C. На следващия ден се правят две промивки с 200 µl/ямка разтвор на 0,05 % Tween 20 в PBS и една промивка само с PBS. След това във всяка ямка се накапват 50 µl стандарт (AGE-BSA в концентрация от 1 до 4000 µg/ml) или аналитична проба (серум или урина) и 50 µl анти-AGE антитяло (анти-CML или анти-имидазолон), разредено в 0,25 % BSA (разтворен в PBS) до титри съответно за анти-CML антитялото 1:100 и за анти-имидазолоновото антитяло 1:2000. При провеждане на ELISA с анти-имидазолоновото антитяло се използва второ антитяло, анти-миши IgG-HRP, което се добавя непосредствено в конкурентната реакционна смес в титър 1:16 000. При провеждане на ELISA с анти-CML антитялото това не се налага, тъй като това антитяло е директно конюгирано с пероксидаза. Конкуrentната реакция се провежда 3 часа на 37°C, след което се

прави трикратна промивка, както по-горе описаната. Имунологичната реакция се проявява като във всяка ямка се накапват по 100  $\mu\text{l}$  50 mM цитратен буфер (pH 6), съдържащ 1  $\mu\text{g/ml}$  о-фенилендиамин (OPD) и 0,02% водороден пероксид. Реакцията се спира с по 100  $\mu\text{l}$ /ямка 0,8 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Измерва се абсорбцията при  $\lambda=490$  nm. За обработка на данните се използва 4-параметрична (4P) логистична крива и концентрацията на N-( $\epsilon$ )-CML и имидазолон се изразява като микрограм-еквиваленти ( $\mu\text{g}/\text{Eq}$ ) AGE-BSA.

#### **2.4.2. Директна ELISA за определяне титрите на анти-AGE антитела**

Плаките за ELISA се инкубират за една нощ на 37°C със 100  $\mu\text{l}$  /ямка 10  $\mu\text{g/ml}$  AGE-BSA, разтворени в 50 mM карбонатен буфер с pH 9,6. На следващия ден разтворът се изхвърля и се заменя с по 100  $\mu\text{l}$ /ямка 3% BSA в PBS (без междинна промивка). След блокиране в продължение на 1 час на 37°C, плаката се промива два пъти с 200  $\mu\text{l}$ /ямка 0,05% Tween 20 в PBS и един път само с PBS. Серумите и урината се накапват по 100  $\mu\text{l}$ /ямка. Инкубира се 2 часа на 37°C, след което ямките се промиват, както по-горе. Накапват се по 100  $\mu\text{l}$ /ямка анти-човешки IgG-HRP след разреждане 1:4000 в 0,25% BSA/PBS. Инкубира се 1 час на 37°C и ямките се промиват, както е описано по-горе. Имунологичната реакция се проявява като във всяка ямка се накапват по 100  $\mu\text{l}$  50 mM цитратен буфер (pH 6), съдържащ 1  $\mu\text{g/ml}$  OPD и 0,02% водороден пероксид. Реакцията се спира с по 100  $\mu\text{l}$ /ямка 0,8 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Измерва се абсорбцията при  $\lambda=490$  nm.

#### **2.4.3. Определяне на фруктозамини**

Тестът се провежда в 96-ямкова полистиренови (PS) плаки за клетъчни култури, където се накапват по 10  $\mu\text{l}$  от стандартни разтвори с известна концентрация на фруктозамини в границите от 0.06 mM до 8 mM и по 10  $\mu\text{l}$  серум или урина. Към всяка ямка се добавят по 100  $\mu\text{l}$  разтвор на тетразолово синьо (0.25 mM тетразолово синьо, 100 mM карбонатен буфер, pH 10). Пробите се инкубират на стайна температура 2 часа, след което се измерва тяхното поглъщане при 530 nm. Построява се стандартна права и по нея се изчислява концентрацията на фруктозамините в пробите от серум и урина.

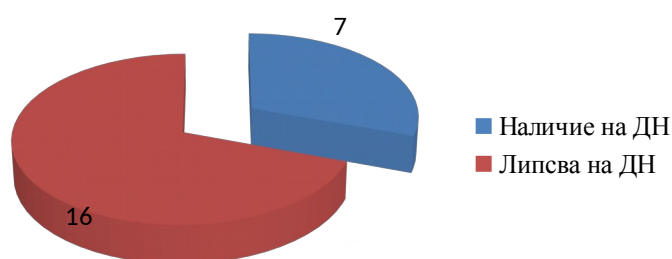
Определянето на нивата на продуктите на гликиране и антителата насочени срещу AGEs в плазмата от контролната група доброволни донори послужи за определяне на граничните стойности (cut-off), над които нивата определени при проучваните пациенти със ЗД, се приемат за повишени (положителни), а под които – за референтни (отрицателни). За гранични нива на стойности на съответните продукти на гликиране и антителата насочени срещу AGEs се приеха средните стойности от определените им нива при доброволците донори на плазма, събрани с три стандартни отклонения:

$$\text{Cut-off} = \text{Mean (контрола)} + 3\text{SD}$$

## 2.5. Други клинични методи:

При всички пациенти е провеждан скрининг за диабетна нефропатия. Диагнозата диабетна нефропатия е поставена съгласно критериите на Американската асоциация за диабет – екскреция на патологично количество албумин с урината ( $\text{alb.} > 300 \text{ mg./24 h}$ ), наличие на офталмоскопски данни за диабетна ретинопатия, липса на клинични и лабораторни данни за друго заболяване на отделителната система.

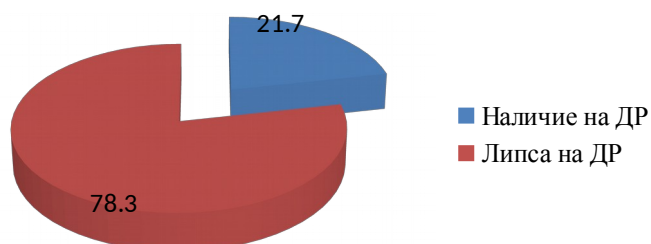
При 7 от проучваните пациенти (30,4%) е налице диабетна нефропатия, докато при 16 пациента (69,6%) липсва такава (фиг. 12).



**Фиг. 12.** *Разпределение на пациентите според наличието и липсата на диабетна нефропатия*

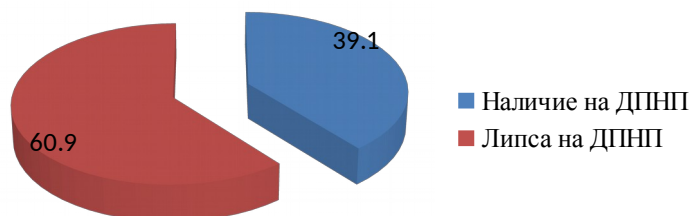
При всички пациенти със ЗД е провеждан скрининг за диабетна ретинопатия чрез провеждане на офталмоскопия. Диагностицирането на ДР се осъществява съгласно Международните клинични препоръки за ДР, издадени от Международната конференция по офталмология. Резултатите са определени като липса на очевидна ретинопатия, непролиферативна диабетна ретинопатия и пролиферативна диабетна ретинопатия.

При 18 от проучените пациенти (78,3%) липсва диабетна ретинопатия, докато такава е налице при 5 пациенти (21,7%) (фиг.13).



**Фиг. 13.** *Разпределение на пациентите според наличието или липсата на ретинопатия*

При проучваните пациенти е провеждана консултация с невролог и ЕМГ за диагностициране на диабетна полиневропатия. При 14 от пациентите (60,9%) липсва диабетна полиневропатия, докато такава е налице при 9 пациенти (39,1%) (фиг.14).



**Фиг. 14.** *Разпределение на пациентите според наличието или липсата на диабетна полиневропатия*

## 2.6. Дизайн на изследването:

Проведено е проспективно едноцентрово кроссекционно проучване, включващо пациенти с диагностициран ЗД в хода на което са проучени зависимости между промените в клинично-лабораторните параметри и продуктите на неензимно гликиране на белтъците, както и антителата насочени срещу AGEs.

## 2.7. Статистически методи за обработка на резултатите:

Данните са въведени и обработени със софтуерни пакети Microsoft Excel<sup>®</sup>, 2007 и GraphPad Prism<sup>®</sup>, ver.5.00.

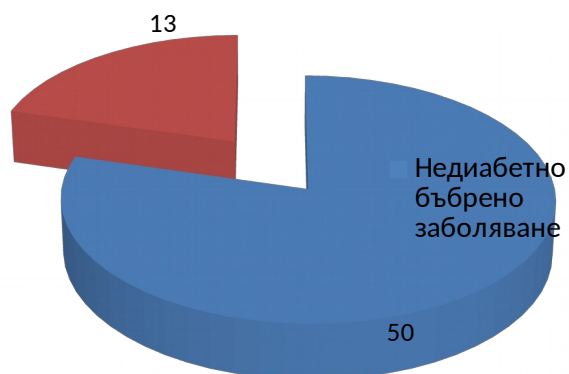
За представяне и оценка на достоверността на получените резултати са прилагани следните статистически методи: дискриптивен анализ с представяне на количествени параметри като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение (SD) или диапазон от стойности в зависимост от вида на честотното разпределение; непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов за проверка типа на честотното разпределение; кростабулация с метода  $\chi^2$  и екзактен тест на Fisher за проверка на хипотези за връзка между категориен признаци; непараметричен тест на Mann-Whitney за проверка на хипотези за различие между две независими извадки; непараметричен рангов тест на Wilcoxon за проверка на хипотези за различие между две зависими извадки; One-way ANOVA за сравняване на повече от две извадки с множествен сравнителен пост-тест на Bonferroni; корелационен анализ; линеен регресионен анализ; графично и таблично представяне на получените резултати.

Получените резултати приехме като статистически достоверни при прагово ниво на значимост на  $p < 0.05$ .

## V. Резултати:

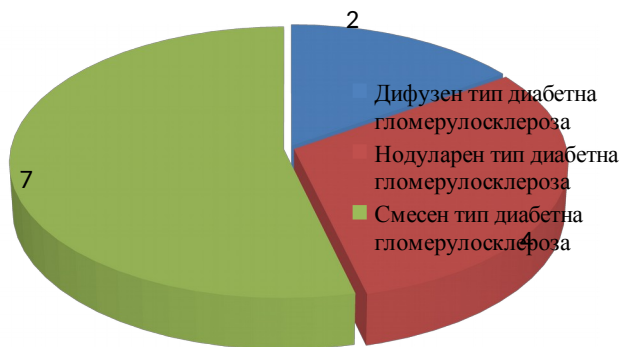
### 1. ДА СЕ ОПРЕДЕЛИ ЧЕСТОТА И ТИПЪТ МОРФОЛОГИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ, КОИТО СА ИМАЛИ ПОКАЗАНИЯ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА ПУНКЦИОННА БЪБРЕЧНА БИОПСИЯ.

Общият брой пациенти със ЗД, които са имали показания за провеждане на пункционна бъбречна биопсия е 63. При 13 от тях (20,6%) се установява ДН, докато при останалите 50 пациенти (79,4%) е налице друго дифузно бъбречно заболяване (фиг. 15).



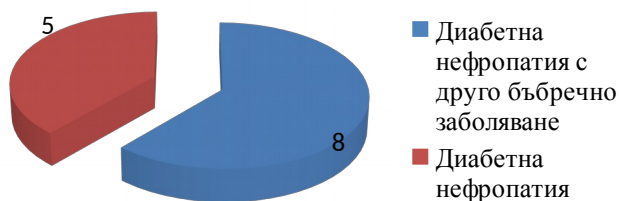
**Фиг. 15.** *Разпределение на пациентите според наличието или липсата на диабетна ретинопатия*

Сред пациентите с ДН се установява: дифузен тип диабетна гломерулосклероза – при 2 пациенти (15,4%); нодуларен тип диабетна гломерулосклероза – при 4 пациенти (30,8%) и смесен тип диабетна гломерулосклероза – при 7 пациенти (53,8%) (фиг.16).

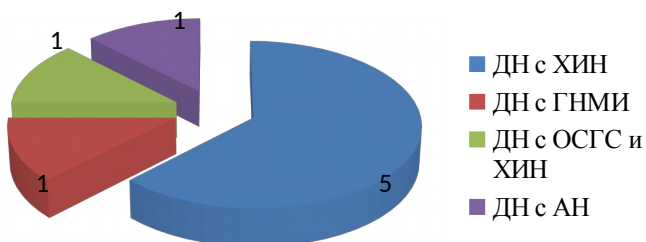


**Фиг. 16.** Разпределение на пациентите според типа диабетна гломерулосклероза

При 5 (38,5%) пациенти с диабетна нефропатия не се установяват хистологични данни за друго бъбречно заболяване. При 8 (61,5%) пациенти е налице диабетна нефропатия, съчетана с хистологични данни за друго дифузно бъбречно заболяване - при 5 от пациентите (62,5%) е установен хроничен интерстициален нефрит; при 1 от пациентите (12,5%) – гломерулонефрит с минимални изменения, при 1 от пациентите (12,5%) – огнищна сегментна гломерулна склероза с хроничен интерстициален нефрит, при 1 от пациентите (12,5%) – амилоидна нефропатия (фиг.17, 18).



**Фиг. 17.** Разпределението на пациентите с ДН според наличието или липсата на друго бъбречно заболяване.



**Фиг. 18.** *Разпределение на пациентите с ДН съчетана с друго бъбречно заболяване според типа морфологично изменение*

Сред пациентите без хистологични данни за ДН се установява: хроничен интерстициален нефрит – при 11 пациенти (22,0%); мембранозна нефропатия – при 9 пациенти (18,0%); ОСГС – при 4 (8,0%) пациенти; гломерулонефрит с минимални изменения – при 4 пациенти (8,0%); амилоидна нефропатия – при 4 пациенти (8,0%); хипертензивна нефропатия – при 4 пациенти (8,0%); IgA нефропатия – при 2 пациенти (4,0%); мезангиопролиферативен гломерулонефрит – при 2 пациенти (4,0%); мембранопролиферативен гломерулонефрит – при 1 пациент (2,0%); микроскопски полиангиит – при 1 пациент (2,0%); лупусна нефропатия – при 2 пациенти (4,0%); миеломна нефропатия – при 1 пациент (2,0%); антигломерулобазалномембранен гломерулонефрит – при 1 пациент (2,0%) ; вторична ОСГС – при 4 пациенти (8,0%) (фиг.19).



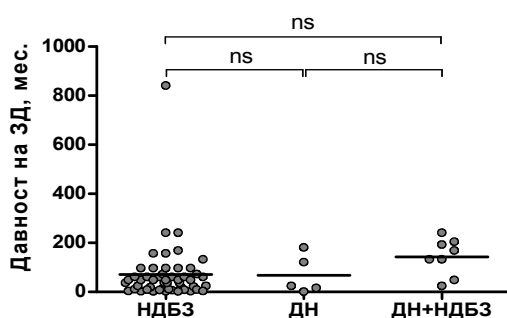
**Фиг. 19.** *Разпределение на пациентите без ДН възвисност от типа морфологични изменения*

## 2. АНАЛИЗ НА ОСНОВНИТЕ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ.

Пациенти със ЗД и НДБЗ са 50, от които 33 (66,0%) мъже и 17 (34,0%) жени. Пациентите със ЗД и наличие само на ДН са 5 (100,0%) мъже. Пациентите със ЗД и ДН, в съчетание с друго бъбречно заболяване са 8 (100,0%) мъже. В нашето проучване изследвахме и съпоставихме основните клиничко-лабораторни показатели при трите групи пациенти.

### 2.1. Давност на ЗД.

Средната давност на ЗД при пациентите с хистологични данни за НДБЗ е  $70,7 \pm 124,9$  месеца, тази при пациентите с хистологични данни само за ДН е  $67,8 \pm 78,5$  месеца, а тази при пациентите с хистологични данни за ДН и НДБЗ е  $142,5 \pm 75,2$  месеца. Няма статистически значима разлика в средната давност на захарния диабет между трите групи пациенти (One-way ANOVA,  $p=0,2768$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, Фигура 20, Таблица 5).



**Фигура 20.** Сравнителен анализ на давността на ЗД при групите от пациентите с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ. Липсва значима разлика между средната давност на ЗД между различните групи (One-way ANOVA,  $p=0,2768$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns – несигнификантна разлика).

**Таблица 5.** Множествен сравнителен тест на Bonferroni на средната давност на ЗД между групите от пациенти с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	T	Significant? P <0,05?	95% CI of diff
НДБЗ с ДН	2,940	0,05332	He	-132.9 to 138.7

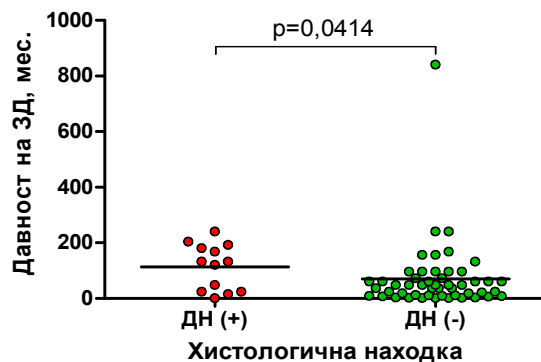
НДБЗ с ДН+НДБЗ	-71,76	1,603	Не	-182.0 to 38.49
ДН с ДН+НДБЗ	-74,70	1,115	Не	-239.8 to 90.36

Сред всички изследвани пациенти със захарен диабет (N=63), при 22 е налице давност на ЗД от 6 или повече години (от 72 и повече месеца), като сред тях при 8 (36,4%) са налице хистологични данни за ДН, а при 14 (63,6%) липсват хистологични данни за ДН. При 41 от пациентите давността на ЗД е под 6 години (под 72 месеца). Сред тях при 5 (12,2%) са налице хистологични признаци на ДН, а при 36 (87,8%) липсват хистологични данни за ДН (Таблица 6). Това разпределение показва, че в изследваната група пациенти давност на захарния диабет от 6 и повече години статистически значимо определя наличието на хистологични признаци за ДН (Fisher's exact test, two-sided,  $p=0,0467$ ) с чувствителност (Se) 61,5%, специфичност (Sp) 72,0%, позитивна предиктивна стойност (PPV) 36,4%, негативна предиктивна стойност (NPV) 87,8%, относителен риск (RR) 2,98 и съотношение на шансовете (OR) 4,11.

**Таблица 6.** Разпределение на пациентите със ЗД според наличието на давността на ЗД и наличието на хистологични признаци за ДН.

Общо пациенти (N=63)	Наличие на ДН	Липса на ДН	Общо
Пациенти с давност на ЗД $\geq 6$ години	8	14	22
Пациенти с давност на ЗД $< 6$ години	5	36	41
Общо	13	50	63

При пациентите с хистологични данни за ДН средната давност на ЗД е  $113,8 \pm 82,3$  месеца, докато при пациентите без хистологични данни за ДН средната давност на ЗД е  $70,7 \pm 124,9$  месеца. Налице е статистически значимо по-голяма давност на ЗД при пациентите с хистологични данни за ДН в сравнение с тази при пациентите без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,0414$ , Фигура 21).



**Фигура 21.** Сравнителен анализ на давността на ЗД при пациентите с и без хистологични данни за ДН. (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,0414$ ).

## 2.2. Компенсация на инсулиновите резерви.

Сред всички изследвани пациенти със ЗД (N=63), при 13 са налице изчерпани инсулинови резерви, т. е. пациентите провеждат инсулиново лечение, като сред тях при 7 (53,8%) са налице хистологични данни за ДН, а при 6 (46,2%) липсват хистологични данни за ДН. При 50 от пациентите са налице компенсирани инсулинови резерви. Сред тях при 6 (12,0%) са налице хистологични данни за ДН, а при 44 (88,0%) липсват хистологични данни за ДН (Таблица 7). Това разпределение показва, че в изследваната група пациенти със ЗД наличието на изчерпани инсулинови резерви, т. е. провеждането на инсулиново лечение статистически значимо определя наличието на хистологични данни за ДН (Fisher's exact test, two-sided, p=0,0029) с Se 53,9%, Sp 88,0%, PPV 53,9%, NPV 88,0%, RR 4,49 и OR 8,56.

**Таблица 7.** Разпределение на пациентите със ЗД според компенсацията на инсулиновите резерви и наличието на хистологични признаци за ДН.

Общо пациенти (N=63)	Наличие на ДН	Липса на ДН	Общо
Инсулиново лечение	7	6	13
Лечение без инсулин	6	44	50
Общо	13	50	63

### 2.3. Диабетна ретинопатия.

Сред всички изследвани пациенти със ЗД (N=63), при 8 са били установени офталмоскопски данни за диабетна ретинопатия (ДР), като сред тях при 7 (87,5%) са налице хистологични данни за ДН, а при 1 (12,5%) липсват хистологични данни за ДН. При 55 пациенти липсват офталмоскопски данни за ДР, като сред тях при 6 (10,9%) са налице хистологични данни за ДН, а при 49 (89,1%) липсват хистологични данни за ДН (Таблица 8). Това разпределение показва, че в изследваната група пациенти със ЗД наличието на офталмоскопски данни за диабетна ретинопатия статистически значимо определя наличието на хистологични данни за ДН (Fisher's exact test, two-sided, p<0,0001) с Se 53,9%, Sp 98,0%, PPV 87,5%, NPV 89,1%, RR 8,02 и OR 57,17.

**Таблица 8.** Разпределение на пациентите със ЗД според наличието на ДР и наличието на хистологични признаци за ДН.

Общо пациенти (N=63)	Наличие на ДН	Липса на ДН	Общо
Наличие на ДР	7	1	8
Липса на ДР	6	49	55
Общо	13	50	63

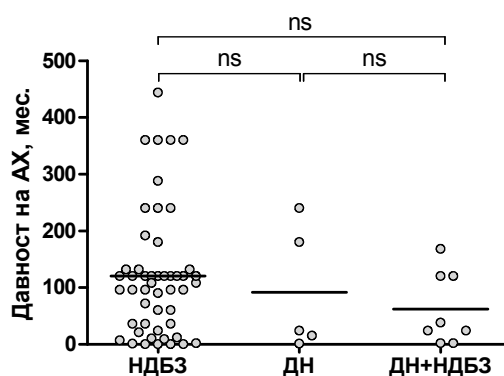
### 2.4. Диабетна полиневропатия.

Сред всички изследвани пациенти със ЗД (N=63), при 11 са били установени данни за диабетна полиневропатия (ДПНП), като сред тях при 1 (9,1%) са налице хистологични данни за ДН, а при 10 (90,9%) липсват хистологични данни за ДН. При 52 пациенти липсват данни за ДПНП, като сред тях при 12 (23,1%) са налице хистологични данни за ДН, а при 40 (76,9%)

липсват хистологични данни за ДН. Това разпределение показва, че в изследваната група пациенти със ЗД наличието на ДПНП не определя статистически значимо наличието на хистологични данни за ДН (Fisher's exact test, two-sided,  $p=0,4333$ ).

## 2.5. Артериална хипертония.

Средната давност на АХ при пациентите с хистологични данни за НДБЗ е  $120,6 \pm 111,1$  месеца, тази при пациентите с хистологични данни само за ДН е  $92,0 \pm 110,1$  месеца, а тази при пациентите с хистологични данни за ДН и НДБЗ е  $62,3 \pm 64,0$  месеца. Няма статистически значима разлика в средната давност на артериалната хипертония между трите групи пациенти (One-way ANOVA,  $p=0,3327$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, Фигура 22, Таблица 9).



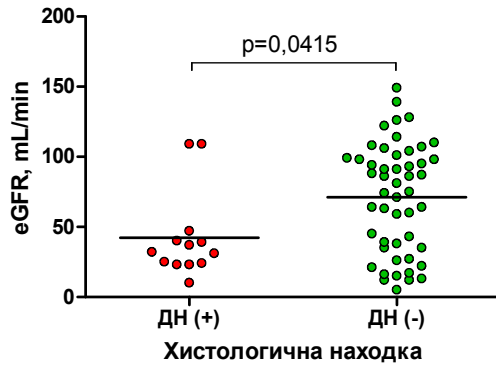
**Фигура 22.** Сравнителен анализ на давността на АХ при групите от пациентите с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ. Липсва значима разлика между средната давност на АХ между различните групи (One-way ANOVA,  $p=0,3327$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns – несигнификантна разлика).

**Таблица 9.** Множествен сравнителен тест на Bonferroni на средната давност на АХ между групите от пациенти с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	T	Significant? $P < 0,05$ ?	95% CI of diff
НДБЗ с ДН	28,64	0,5730	He	-94.47 to 151.8
НДБЗ с ДН+НДБЗ	58,39	1,439	He	-41.56 to 158.3
ДН с ДН+НДБЗ	29,75	0,4897	He	-119.9 to 179.4

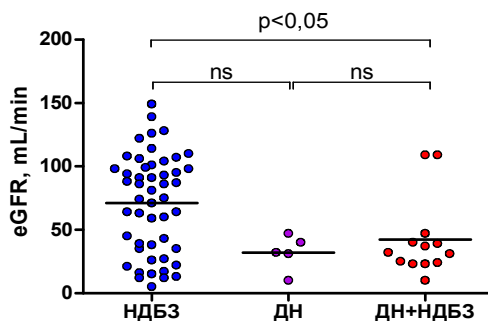
## 2.6. Скорост на гломерулна филтрация.

При пациентите с хистологични данни за ДН средната изчислена скорост на гломерулна филтрация (eGFR, mL/min) е  $42,2 \pm 31,1$  mL/min, докато при пациентите без хистологични данни за ДН средната eGFR е  $71,0 \pm 38,8$  mL/min. Налице е статистически значимо по-ниска eGFR при пациентите с хистологични данни за ДН, в сравнение с тази при пациентите без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,0415$ , Фигура 23).



**Фигура 23.** Сравнителен анализ на изчислената скорост на гломерулна филтрация при пациентите с и без хистологични данни за ДН. (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,0415$ ).

Тази зависимост се потвърждава и при сравнителен анализ сред трите групи пациенти: с хистологични данни за НДБЗ без ДН, с хистологични данни за ДН без НДБЗ и с хистологични данни за ДН и НДБЗ. При пациентите със ЗД с хистологични данни за НДБЗ без ДН средната eGFR е  $71,0 \pm 38,8$  mL/min, при пациентите с хистологични данни за ДН, без НДБЗ средната eGFR е  $32,0 \pm 13,9$  mL/min, а при пациентите с хистологични данни за ДН и НДБЗ средната eGFR е  $42,2 \pm 31,1$  mL/min. При сравнителен анализ в трите групи пациенти се установи статистически значима разлика между средните eGFR при пациентите с НДБЗ и тези с ДН+НДБЗ (One-way ANOVA,  $p=0,0084$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, Фигура 24, Таблица 10).



**Фигура 24.** Сравнителен анализ на изчислената скорост на гломерулна филтрация при групите от пациентите с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ. Налице е значима разлика между средната скорост на гломерулна филтрация при пациентите с НДБЗ и тази при пациентите с ДН+НДБЗ (One-way ANOVA,  $p=0,0084$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns – несигнификантна разлика).

**Таблица 10.** Множествен сравнителен тест на Bonferroni на средната изчислена скорост на гломерулна филтрация между групите от пациенти с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ.

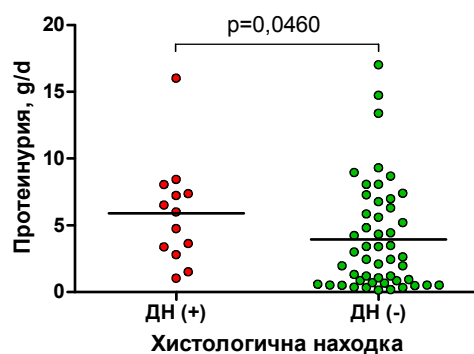
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	T	Significant? P < 0,05?	95% CI of diff
НДБЗ с ДН	39,04	2,286	Не	-2.934 to 81.01
НДБЗ с ДН+НДБЗ	28,81	2,541	Да (*)	0.9495 to 56.67
ДН с ДН+НДБЗ	-10,23	0,5339	Не	-57.32 to 36.86

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между давността на ЗД и eGFR при изследване на зависимостта сред всички пациенти със ЗД, включени в проучването (N=63) (Spearman, two-tailed,  $r=-0,1724$ ,  $p=0,1768$ ). Липса на статистически значима корелационна зависимост се потвърди и при изследване само на пациентите със ЗД с хистологични данни за НДБЗ без ДН (Spearman, two-tailed,  $r=-0,1317$ ,  $p=0,3428$ ), при изследване на пациентите със ЗД с хистологични данни за ДН без НДБЗ (Spearman, two-tailed,  $r=0,600$ ,  $p=0,3500$ ) и при изследване на пациентите със ЗД с хистологични данни за ДН с НДБЗ (Spearman, two-tailed,  $r=-0,2583$ ,  $p=0,3942$ ).

## 2.7. Протеинурия.

Сред всички изследвани пациенти със захарен диабет (N=63) не се установи статистически значима корелационна зависимост между давността на захарния диабет (месеци) и протеинурията (g/d) (Spearman, two-tailed,  $r=-0,0416$ ,  $p=0,7463$ ). Липсата на такава значима корелационна зависимост се потвърди и сред пациентите със ЗД с хистологични данни за НДБЗ, но без ДН (Spearman, two-tailed,  $r=-0,1912$ ,  $p=0,1834$ ), сред пациентите със ЗД с хистологични данни за ДН, без НДБЗ (Spearman, two-tailed,  $r=0,0000$ ,  $p=1,0500$ ), както и сред пациентите със ЗД с хистологични данни за ДН и НДБЗ (Spearman, two-tailed,  $r=0,1653$ ,  $p=0,5894$ ).

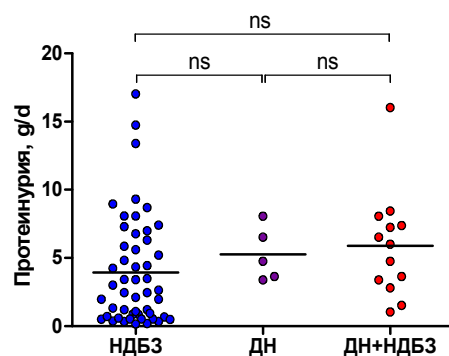
Сред всички изследвани пациенти със захарен диабет (N=63), при пациентите с хистологични данни за ДН средната протеинурия е  $5,90\pm 3,90$  g/d, докато при пациентите със ЗД без хистологични данни за ДН средната протеинурия е  $3,94\pm 3,99$  g/d. Налице е статистически значимо по-висока протеинурия при пациентите с хистологични данни за ДН (Mann-Whitney, two-tailed,  $p=0,0460$ , Фигура 25).



**Фигура 25.** Сравнителен анализ на протеинурията (g/d) при пациентите с и без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,0460$ ).

При анализ на стойностите на протеинурията при трите различни групи пациенти със ЗД, при наличие на хистологични данни за НДБЗ без ДН средната протеинурия е  $3,94\pm 3,99$  g/d; при

наличие на хистологични данни за ДН без НДБЗ средната протеинурия е  $5,26 \pm 1,99$  g/d; при наличие на хистологични данни едновременно за ДН и НДБЗ средната протеинурия е  $5,90 \pm 3,90$  g/d. Въпреки, че относително най-високи стойности на протеинурията се установяват при пациентите с комбинирани хистологични белези за ДН и НДБЗ, липсва статистически значима разлика в средните стойности на протеинурията между трите различни групи пациенти (One-way ANOVA,  $p=0,2453$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns – несигнификантна разлика, Фигура 26, Таблица 11).



**Фигура 26.** Сравнителен анализ на протеинурията при групите от пациентите с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ. Липсва значима разлика между средната стойност на протеинурията при трите групи пациенти (One-way ANOVA,  $p=0,2453$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns – несигнификантна разлика).

**Таблица 11.** Множествен сравнителен тест на Bonferroni на средната протеинурия между групите от пациенти с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	T	Significant? P < 0,05?	95% CI of diff
НДБЗ с ДН	-1,313	0,7224	He	-5.781 to 3.154
НДБЗ с ДН+НДБЗ	-1,952	1,618	He	-4.917 to 1.013
ДН с ДН+НДБЗ	-0,6386	0,3131	He	-5.651 to 4.374

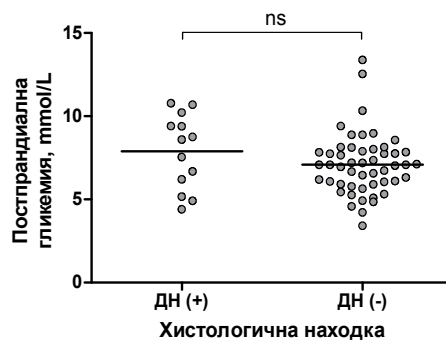
## 2.8. Уринен седимент.

При изследване на уринния седимент при всички проучвани пациенти със ЗД (N=63) установихме, че наличието на патологично активен уринен седимент (над 5 еритроцита/ $\mu$ L и/или над 5 левкоцита/ $\mu$ L) не определя статистически значимо наличието на недиабетно бъбречно заболяване (Fisher's exact test, two-sided,  $p=0,3603$ ). Същата липса на зависимост установихме и при изследване само на пациентите със ЗД с масивна по степен протеинурия – наличието на патологично активен уринен седимент не определя статистически значимо наличието на хистологични данни за недиабетно бъбречно заболяване (Fisher's exact test, two-sided,  $p=0,1389$ ). При пациентите със ЗД и хистологично установени признаци за ДН, наличието на патологично активен уринен седимент не определя статистически значимо наличието на хистологични признаци за НДБЗ (Fisher's exact test, two-sided,  $p=0,5928$ ).

## 2.9. Гликемия.

При изследване на гликемията нагладно, при пациентите със захарен диабет и хистологични данни за ДН средната концентрация на кръвната захар нагладно е  $6,68 \pm 2,88$  mmol/L, а тази при пациентите без хистологични данни за ДН –  $6,95 \pm 2,12$  mmol/L. Липса статистически значима разлика между гликемията нагладно при пациентите със захарен диабет с хистологични данни за ДН и тази при пациентите със ЗД без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,9188$ ).

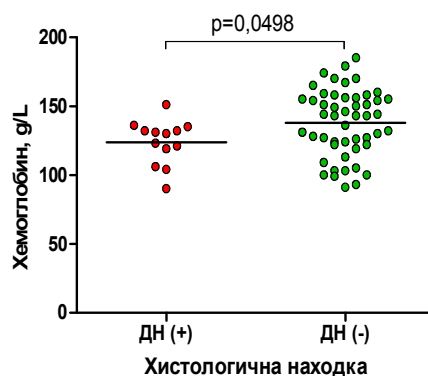
При изследване на постпрандиалната гликемия установихме същата липса на статистически значима разлика между средната кръвна концентрация на глюкоза 2 часа след нахранване при пациентите с хистологични данни за ДН ( $7,89 \pm 2,24$  mmol/L) и тази при пациентите без хистологични данни за ДН ( $7,10 \pm 1,85$  mmol/L) (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,1909$ , Фигура 27), въпреки че средната гликемия при пациентите с хистологично установена ДН е относително по-висока от тази при пациентите без хистологични данни за ДН.



**Фигура 27.** Сравнителен анализ на постпрандиалната гликемия при пациентите с и без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,1909$ , ns – незначителна разлика).

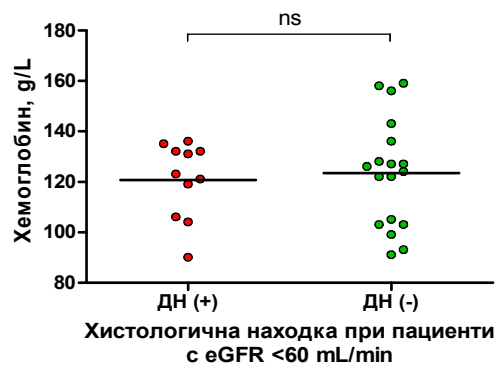
#### 2.10. Нива на хемоглобина.

Средното ниво на хемоглобина (g/L) при пациентите със ЗД с хистологично установена ДН е  $123,8 \pm 16,1$  g/L, а това при пациентите със ЗД без хистологични данни за ДН е  $138,1 \pm 24,2$  g/L, като е налице статистически значима разлика в двете нива (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,0498$ , Фигура 28).



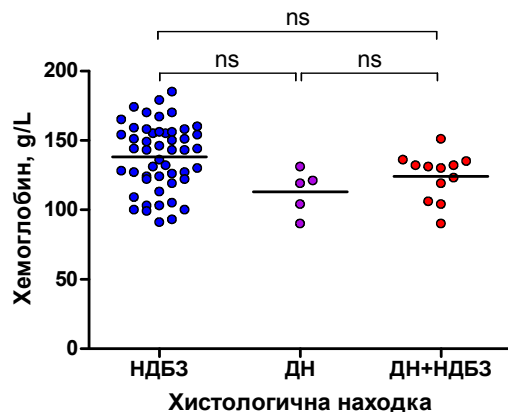
**Фигура 28.** Сравнителен анализ на нивата на хемоглобина (g/L) при пациентите с и без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,0498$ ).

При изследване на нивата на хемоглобина при пациенти с декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) (n=29) установихме относително по-ниско средно ниво на хемоглобина при пациентите със ЗД с хистологични данни за ДН ( $120,8 \pm 15,0$  g/L) в сравнение със средното ниво на хемоглобина при пациентите със ЗД без хистологични данни за ДН ( $123,4 \pm 21,5$  g/L), въпреки че липсва статистически значима разлика между двете нива (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,9284$ , Фигура 29).



**Фигура 29.** Сравнителен анализ на нивата на хемоглобина (g/L) при пациентите с декомпенсирана бъбречна функция с и без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed,  $p=0,9284$ ).

Средното ниво на хемоглобин при пациентите със ЗД с хистологични данни за НДБЗ без ДН е  $138,1 \pm 24,2$  g/L, това при пациентите със ЗД с хистологични данни за ДН без НДБЗ е  $113 \pm 16,1$  g/L, а нивото при пациентите със ЗД и хистологични данни за ДН с НДБЗ е  $124,1 \pm 16,8$  g/L. Въпреки относително най-високото средно ниво на хемоглобина при пациентите с НДБЗ не се установи сигнификантна разлика между групите пациенти, разпределени според хистологичната находка за ДН и НДБЗ (One-way ANOVA,  $p=0,0211$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, Фигура 30, Таблица 12).



**Фигура 30.** Сравнителен анализ на нивата на хемоглобина при групите от пациентите с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ. Липсва значима разлика между средната стойност на хемоглобина при трите групи пациенти (One-way ANOVA,  $p=0,0211$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns – несигнификантна разлика).

**Таблица 12.** Множествен сравнителен тест на Bonferroni на хемоглобина между групите от пациенти с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	T	Significant? P <0,05?	95% CI of diff
НДБЗ с ДН	25,06	2,361	He	-1.038 to 51.16
НДБЗ с ДН+НДБЗ	13,98	1,921	He	-3.909 to 31.86
ДН с ДН+НДБЗ	-11,08	0,9200	He	-40.70 to 18.53

### 3. АНАЛИЗ НА НИВАТА НА ПРОДУКТИТЕ НА ГЛИКИРАНЕ И АНТИТЕЛАТА НАСОЧНИ СРЕЩУ AGEs ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ И ПРИ КОНТРОЛНА ГРУПА ПАЦИЕНТИ. (Mann-Witney test, two-tailed).

Фруктозаминът, AGEs и антитела срещу AGEs в серум и урина са изследвани при всички 23 пациенти със ЗД, включени в проучването, както и при 21 контролно изследвани пациенти без ЗД.

При изследване за фруктозамин при здрави доброволци се установиха серумни нива на фруктозамин  $1,349088 \pm 0,185934$  mM.

Въз основа на това определихме граничната стойност (cut-off), над която серумните нивата на фруктозамин при изследваните пациенти приехме за патологично повишени:

$$\text{Cut-off (fructosamine, серум)} = 1,349088 + 3 \times 0,185934 = 1.906$$

По същия начин определихме граничната стойност (cut-off) и на останалите показатели.

При изследване за фруктозамин в прясна урина при здрави доброволци се установиха нива на фруктозамин  $0,262111 \pm 0,156615$  mM.

Граничната стойност (cut-off) над която нивата на фруктозамин в урината приехме за патологични е:

$$\text{Cut-off (fructosamine, урина)} = 0,262111 + 3 \times 0,156615 = 0,731956$$

В контролната група установихме стойности на фруктозамин в 24 часова урина  $0,288824 \pm 0,165029$  mM.

Граничната стойност (cut-off) над която нивата на фруктозамин в 24 часова урината приехме за патологични е:

$$\text{Cut-off (fructosamine, 24 часова урина)} = 0,288824 + 3 \times 0,165029 = 0,783911$$

В контролна група установихме серумни нива на N(ε)-CML  $1024,974 \pm 359,0042$  μgEq-AGEs-BSA, въз основа на което определихме граничната стойност, над която серумните нива на N(ε)-CML приехме за патологични:

$$\text{Cut-off (N(ε)-CML, серум)} = 1024,974 + 3 \times 359,0042 = 2102$$

В контролна група установихме нива на N(ε)-CML в прясна урина 163,1257±138,1249 μgEq-AGEs-BSA, въз основа на което определихме граничната стойност над която нивата на N(ε)-CML в урина, приехме за патологични:

$$\text{Cut-off (N(ε)-CML}_{\text{, урина}}) = 163,1257 + 3 \times 138,1249 = 577,5004$$

В контролна група установихме нива на N(ε)-CML в 24-часова урина 120,8102±144,8811 μgEq-AGEs-BSA, въз основа на което определихме граничната стойност над която нивата на N(ε)-CML в 24-ч.урина, приехме за патологични:

$$\text{Cut-off (N(ε)-CML}_{\text{, 24 часова урина}}) = 120,8102 + 3 \times 144,8811 = 555,4535$$

В контролна група установихме серумни нива на имидазолон 1913,251±640,9643 μgEq-AGEs-BSA, въз основа на което определихме граничната стойност над която серумните нива на имидазолон, приехме за патологични:

$$\text{Cut-off (имидазолон}_{\text{, серум}}) = 1913,251 + 3 \times 640,9643 = 3836,1439$$

При изследване за Anti-AGEs при здрави доброволци се установиха серумни нива на Anti-AGEs 0,092156±0,011954 единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (ОД 450 nm) на оптична плътност.

Въз основа на това определихме граничната стойност (cut-off), над която серумните нива на anti-AGEs при изследваните пациенти приехме за патологично повишени:

$$\text{Cut-off (Anti-AGEs}_{\text{, серум}}) = 0,092156 + 3 \times 0,011956 = 0,128018$$

При изследване за Anti-AGEs в урина при здрави доброволци се установиха нива на Anti-AGEs в урина 0,107426±0,043428 единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (ОД 450 nm) на оптична плътност.

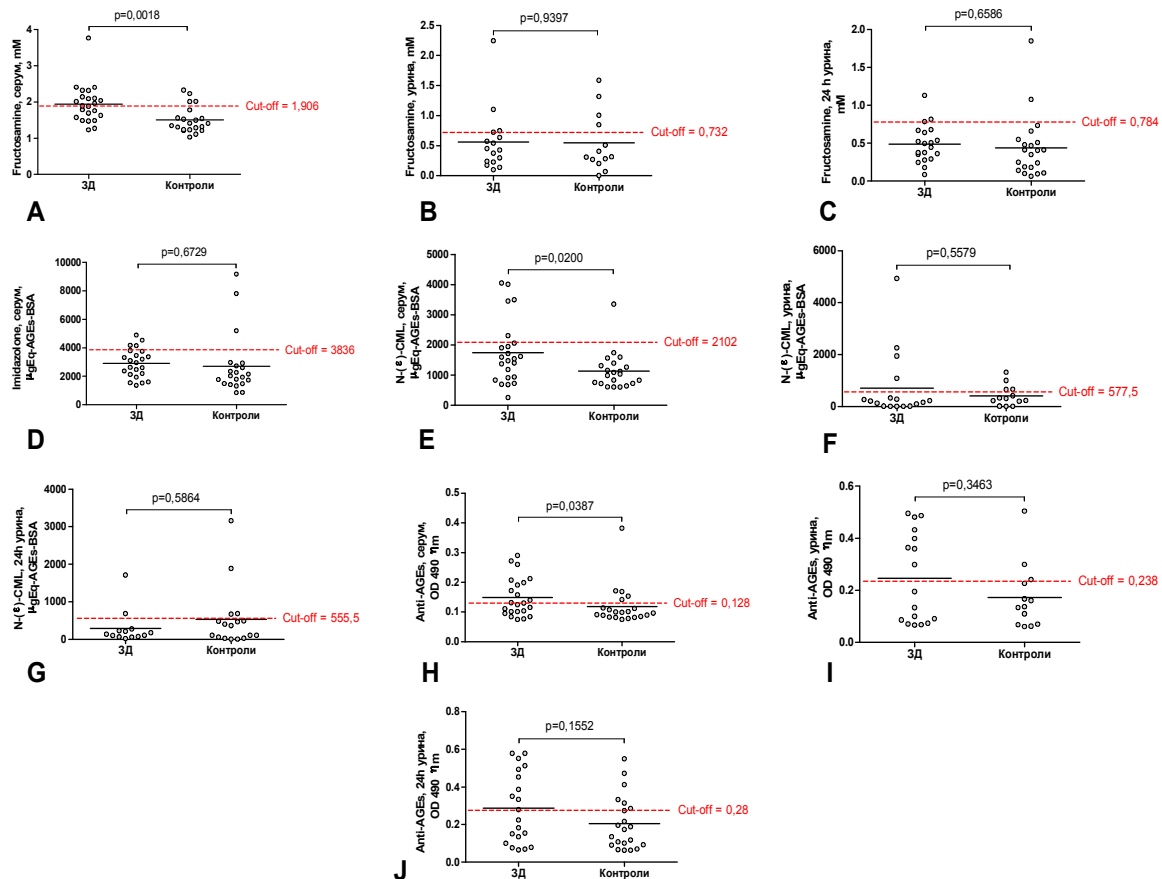
Въз основа на това определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-AGEs в урината при изследваните пациенти приехме за патологично повишени:

$$\text{Cut-off (Anti-AGEs}_{\text{, урина}}) = 0,107426 + 3 \times 0,043428 = 0,23771$$

При изследване за Anti-AGEs в 24-часова урина при здрави доброволци се установиха нива на Anti-AGEs в 24-часова урина 0,119738±0,053273 единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (ОД 450 nm) на оптична плътност.

Въз основа на това определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-AGEs в 24-часова урина при изследваните пациенти приехме за патологично повишени:

$$\text{Cut-off (Anti-AGEs}_{\text{, 24-ч. урина}}) = 0,119738 + 3 \times 0,053273 = 0,279557$$



**Фиг. 31. (А-Ј).** Сравнителен анализ на нивата на ранните и напредналите продукти на гликиране (AGEs) и автоантитела, насочени срещу AGEs при пациентите със захарен диабет и при контролно изследваните пациенти без захарен диабет. (Mann-Witney test, two-tailed).

\* В червено са посочени граничните стойности (cut-off), над които нивото на съответния продукт, респективно на антителата се приемат за патологични.

### 3.1. Серумно ниво на фруктозамин:

При сравнителен анализ на серумното ниво на фруктозамин при диабетици и при здрави контроли, установихме, че при пациентите със захарен диабет средното ниво е  $1,94 \pm 0,53$  mM, а в контролната група е  $1,50 \pm 0,37$  mM. При диабетици серумното ниво на фруктозамин е значимо по-високо в сравнение с контролната група ( $p=0,0018$ ) (фиг. 31-А).

### 3.2. Фруктозамин в прясна урина:

При изследване на серумното ниво на фруктозамин в прясна урина, установихме, че при пациентите със захарен диабет средното ниво е  $0,56 \pm 0,52$  mM, а в контролната група е  $0,55 \pm 0,49$  mM. Не се установи статистическа значима разлика между нивата на фруктозамин в прясна урина при двете групи ( $p=0,9397$ ) (Фиг. 31-В).

### 3.3. Фруктозамин в 24-часова урина:

При анализ на серумното ниво на фруктозамин в 24-часова урина установихме, че при пациентите със захарен диабет средното ниво е  $0,49 \pm 0,25$  mM, а в контролната група е

0,44±0,41 mM. Липсва статистически значима разлика между нивата при двете групи ( $p=0,6586$ ) (Фиг. 31-С).

#### 3.4. Имидазолон в серум:

В нашето проучване при изследване на серумните нива на имидазолон установихме, че при пациентите със захарен диабет средното ниво е  $2907\pm 1016$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$ , а в контролната група е  $2695\pm 2147$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$ . Липсва статистическа значима разлика между серумните нива на имидазолон при двете групи ( $p=0,6729$ ) (Фиг. 31-D).

#### 3.5. N-( $\epsilon$ )-CML в серум:

При пациентите със захарен диабет средното ниво на N-( $\epsilon$ )-CML е  $1743\pm 1073$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$ , а в контролната група е  $1136\pm 616,9$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$ . При диабетици серумното ниво на N-( $\epsilon$ )-CML е значимо по-високо в сравнение с контролната група ( $p=0,02$ ) (Фиг. 31-E).

#### 3.6. N-( $\epsilon$ )-CML в прясна урина:

При пациентите със захарен диабет средното ниво на N-( $\epsilon$ )-CML в прясна урина е  $700,8\pm 1284$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$ , а в контролната група е  $410,7\pm 398,9$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$ . Не се установи статистически значима разлика между нивата на N-( $\epsilon$ )-CML в урината при двете групи ( $p=0,5579$ ) (Фиг. 31-F).

#### 3.7. N-( $\epsilon$ )-CML в 24-часова урина:

При пациентите със захарен диабет средното ниво на N-( $\epsilon$ )-CML в 24-часова урина е  $295,7\pm 458,4$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$ , а в контролната група е  $532,1\pm 816,4$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$ , като липсва статистически значима разлика между нивата при двете групи ( $p=0,5864$ ) (Фиг. 31-G).

#### 3.8. Anti-AGEs в серум:

При пациентите със захарен диабет средното ниво е  $0,149\pm 0,064$  OD при 490 nm, а в контролната група е  $0,119\pm 0,067$  OD при 490 nm, като при диабетици е значимо по-високо ( $p=0,0387$ ) (Фиг. 31-H).

#### 3.9. Anti-AGEs в прясна урина:

При пациентите със захарен диабет средното ниво е  $0,247\pm 0,172$  OD при 490 nm, а в контролната група е  $0,172\pm 0,125$  OD при 490 nm, като липсва значима разлика между нивата при двете групи ( $p=0,3464$ ) (Фиг. 31-I).

#### 3.10. Anti-AGEs в 24-часова урина:

При пациентите със захарен диабет средното ниво е  $0,287\pm 0,188$  OD при 490 nm, а в контролната група е  $0,205\pm 0,143$  OD при 490 nm, като липсва значима разлика между нивата при двете групи ( $p=0,1552$ ) (Фиг.31-J).

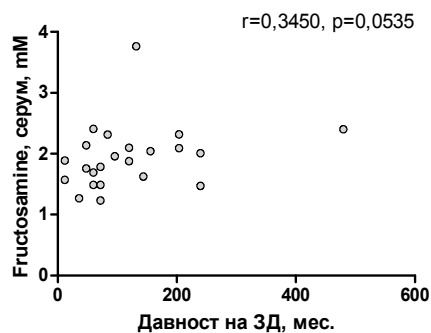
#### 4. АНАЛИЗ НА ВРЪЗКИТЕ НА СЕРУМНИТЕ И УРИННИТЕ НИВА НА ПРОДУКТИТЕ НА ГЛИКИРАНЕ И АНТИТЕЛАТА НАСОЧЕНИ СРЕЩУ AGEs С ОСНОВНИТЕ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ ПОКАЗАТЕЛИ:

##### 4.1. Анализ на връзките на нивата на продукти на гликиране и автоантителата, насочени срещу AGEs с възрастта на пациентите със ЗД

При всички 23 пациенти със захарен диабет включени в проучването, анализирахме връзката на нивата на продуктите на гликиране и Anti-AGEs с възрастта на пациентите. При изследваните пациенти не се установи статистическа значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и серумните нива на фруктозамин, N-(ε)-CML, имидазолон и Anti-AGEs. Липсва такава зависимост между възрастта на пациентите и нивата на фруктозамин, N-(ε)-CML и Anti-AGEs в прясна и 24-часова урина.

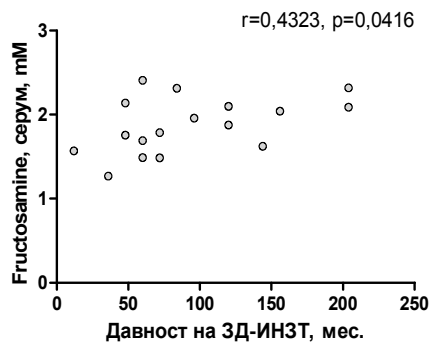
##### 4.2. Анализ на връзката на продуктите на гликиране и Anti-AGEs с давността на ЗД

Средната продължителност на захарния диабет при всички 23 пациенти включени в проучването е  $120,52 \pm 103,32$  месеца. При тези пациенти съпоставихме серумните и уринните нива на продуктите на гликиране и антителата насочени срещу AGEs с давността на диабета.



**Фигура 32.** Анализ на връзката на серумното ниво фруктозамин с давността на захарния диабет.

При анализ на връзката на серумните нива на фруктозамин с давността на ЗД установихме, че при изследваните пациенти няма значима корелационна зависимост между тези показатели (Spearman, one-tailed,  $r=0,3450$ ,  $p=0,0535$ ) (Фиг. 32).



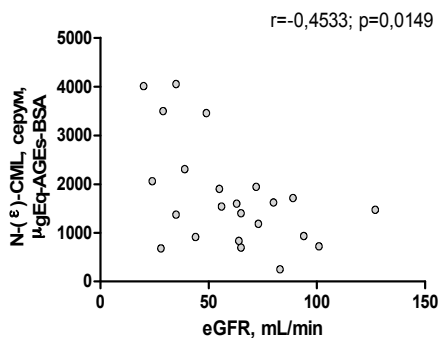
**Фигура 33.** Анализ на връзката на серумното ниво фруктозамин с давността на захарния диабет при пациенти с НИЗТ-ЗД.

Налице е значима позитивна корелационна зависимост между давността на ЗД ИНЗТ и нивата на фруктозамин в серума (Spearman, one-tailed,  $r=0,4323$ ,  $p=0,0416$ ) (Фиг. 33). Такава зависимост не се установи при пациентите с ИЗТ ЗД (Spearman, one-tailed,  $r=0,3769$ ,  $p=2486$ ).

При анализ на връзката между давността на ЗД със серумните нива на N-( $\epsilon$ )-CML, имидазолон и Anti-AGEs, както и с уринните нива на фруктозамина, N-( $\epsilon$ )-CML и Anti-AGEs не установихме статистически значима корелационна зависимост между тези показатели.

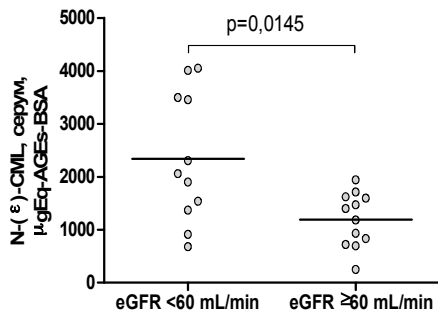
#### 4.3. Анализ на връзките на продукти на гликиране и антителата насочени срещу AGEs и бъбречната функция.

При изследваните пациенти със захарен диабет не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин, имидазолон и Anti-AGEs в серума и изчислената скорост на гломерулна филтрация. Липсва такава зависимост и между нивата на фруктозамин, N-( $\epsilon$ )-CML и Anti-AGEs в прясна и 24-часова урина и изчислената скорост на гломерулната филтрация при тези пациенти.



**Фигура 34.** Анализ на връзка на серумните нива на N-( $\epsilon$ )-CML с eGFR при пациентите със захарен диабет

Единствено е налице статистически значима отрицателна корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в серума и изчислената скорост на гломерулната филтрация при изследваните пациенти (n=23) (Spearman, one-tailed,  $r=-0,4533$ ,  $p=0,0149$ ) (фиг. 34).



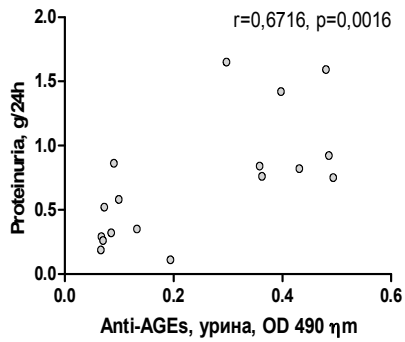
**Фигура 35.** Сравнителен анализ на серумното ниво на N-(ε)-CML при диабетици с  $eGFR < 60 \text{ mL/min}$  и  $eGFR \geq 60 \text{ mL/min}$

Средното ниво на N-(ε)-CML в серума при изследваните пациенти (n=23) с намалена скорост на eGFR под  $60 \text{ mL/min}$  е  $2341,0 \pm 1221,0 \text{ μEq-AGEs-BSA}$ , докато това при пациентите със скорост на eGFR  $\geq 60 \text{ mL/min}$  е  $1194,0 \pm 509,4 \text{ μEq-AGEs-BSA}$ , като е налице статистически значима разлика между тях (Mann-Whitney test, one-tailed,  $p=0,0145$ ) (Фиг. 35).

Сред пациентите с патологично повишени нива на N-(ε)-CML в серума (n=5), тези с  $eGFR < 60 \text{ mL/min}$  са 5 (100%), докато сред пациентите с референтни нива на N-(ε)-CML в серума (n=18), тези с  $eGFR < 60 \text{ mL/min}$  са 6 (33,3%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в серума статистически значимо определя наличието на декомпенсирана бъбречна функция ( $eGFR < 60 \text{ mL/min}$ ) при пациентите със ЗД (Fisher's exact test, one-sided,  $p=0,0137$ ) с Se 45,5%, Sp 100%, PPV 100%, NPV 66,7%, RR 3,0 и OR 21,2.

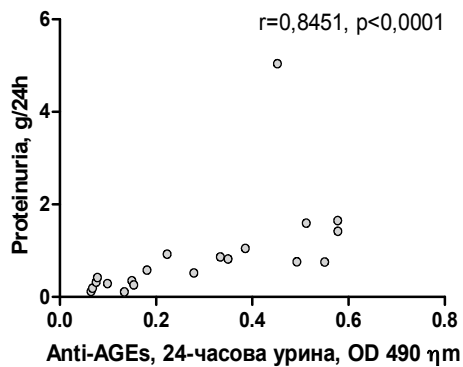
#### 4.4. Анализ на връзките на продукти на гликиране и антителата насочени срещу AGEs с протеинурията.

При изследваните пациенти със захарен диабет не се установи статистически значима корелационна зависимост между серумните и уринните нива на продуктите на гликиране и протеинурията. Липсва такава зависимост и между серумните нива на Anti-AGEs и протеинурията.



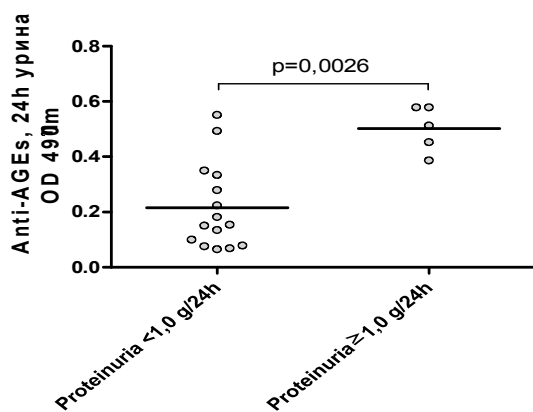
**Фигура 36.** Анализ на зависимостта на нивото на anti-AGEs в прясна урина и протеинурията при пациентите със ЗД

Налице е обаче статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в прясна урина и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД (n=17) (Spearman, one-tailed,  $r=0,6716$ ,  $p=0,0016$ ) (Фиг. 36).



**Фигура 37.** Анализ на зависимостта на нивото на anti-AGEs в прясна урина и протеинурията при пациентите със ЗД

Установи се и статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в 24-часова урина и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД (n=20) (Spearman, one-tailed,  $r=0,8451$ ,  $p<0,0001$ ) (Фиг. 37).

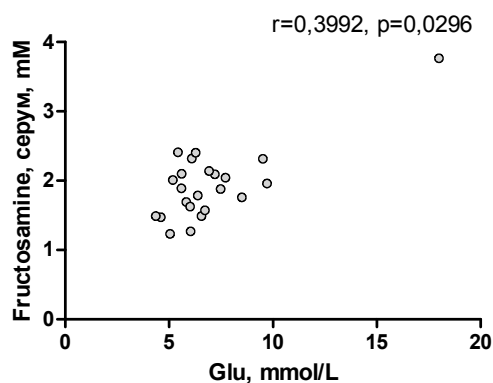


**Фигура 38.** Сравнителен анализ на нивата на Anti-AGEs в 24-часова урина при пациенти с протеинурия < 1,0 g/24h и протеинурия ≥1,0 g/24h

Средното ниво на anti-AGEs в 24-часова урина при изследваните пациенти със ЗД и протеинурия под 1,0 g/24h е  $0,2158 \pm 0,1553$  OD 490 nm, което е статистически значимо по-ниско от средното ниво на anti-AGEs при пациентите с протеинурия  $\geq 1,0$  g/24h, което е  $0,5015 \pm 0,0831$  OD 490 nm (Mann-Whitney test, one-tailed,  $p=0,0026$ ) (Фиг. 38).

#### 4.5. Анализ на връзките между нивата на продуктите на гликиране и антителата срещу AGEs и гликемията

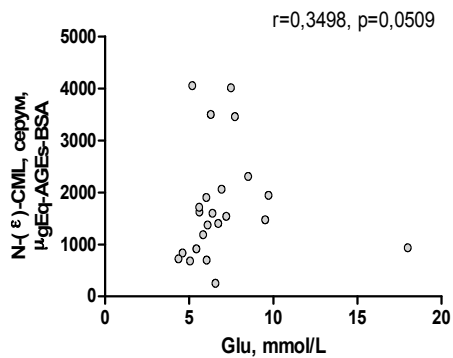
При всички пациенти със Захарен диабет анализирахме зависимостта на серумните и уринните нива на продуктите на гликиране и антителата насочени срещу AGEs с гликемията.



**Фигура 39.** Анализ на връзката на серумните нива на фруктозамин и гликемията на гладно при пациенти със захарен диабет

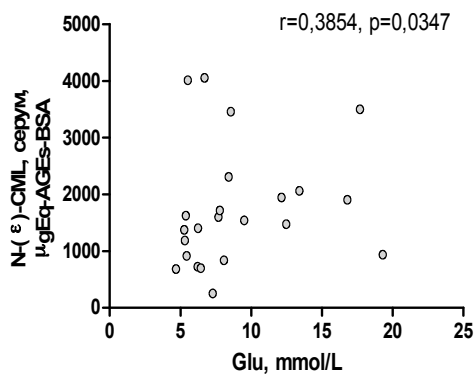
Налице е статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на гликемията на гладно и фруктозамин в серума при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed,  $r=0,3992$ ,  $p=0,0296$ ) (Фиг. 39).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в серума и постпрандиалната гликемия при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed,  $r=0,3399$ ,  $p=0,0563$ ).



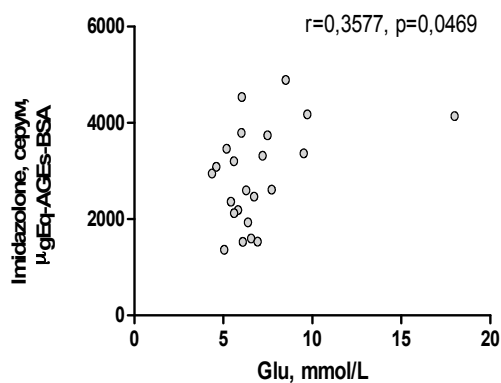
**Фигура 40.** Анализ на връзката на серумните нива на N-(ε)-CML и гликемията на гладно при пациенти със захарен диабет

При пациентите със захарен диабет не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на гликемията на гладно и серумните нива на N-(ε)-CML (Spearman, one-tailed,  $r=0,3498$ ,  $p=0,0509$ ) (Фиг.40).



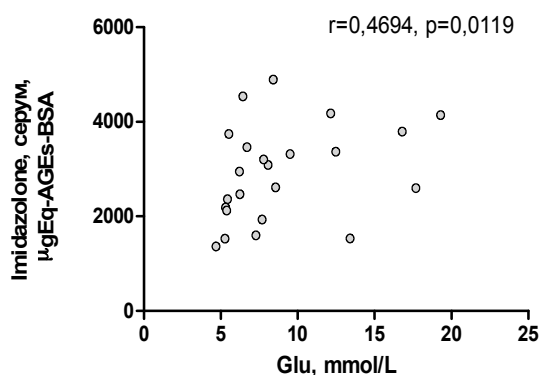
**Фигура 41.** Анализ на връзката на серумните нива на N-(ε)-CML и постпрандиалната гликемия на при пациенти със захарен диабет

Налице е статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и нивата на N-(ε)-CML в серума при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed,  $r=0,3854$ ,  $p=0,0347$ ) (Фиг. 41)



**Фигура 42.** Анализ на връзката на серумните нива на *N*-( $\epsilon$ )-CML и гликемията на гладно при пациенти със захарен диабет

Налице е статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на гликемията на гладно и серумните нива на имидазолон при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed,  $r=0,3577$ ,  $p=0,0469$ ) (Фиг. 42).

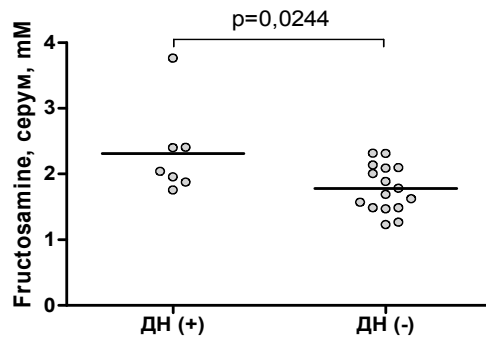


**Фигура 43.** Анализ на връзката на серумните нива на имидазолон и гликемията на гладно при пациенти със захарен диабет

Налице е статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и серумните нива на имидазолон при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed,  $r=0,4694$ ,  $p=0,0119$ ) (Фиг. 43)

## 5. ДА СЕ ОПРЕДЕЛИ ЗНАЧИМОСТТА НА ПРОДУКТИТЕ НА ГЛИКИРАНЕ И АНТИТЕЛАТА НАСОЧЕНИ СРЕЩУ AGEs КАТО МАРКЕРИ ЗА ДИАБЕТНА НЕФРОПАТИЯ

При проучваните пациенти със ЗД изследвахме значимостта на продуктите на гликиране и антителата насочени срещу AGEs като маркери за диабетна нефропатия.

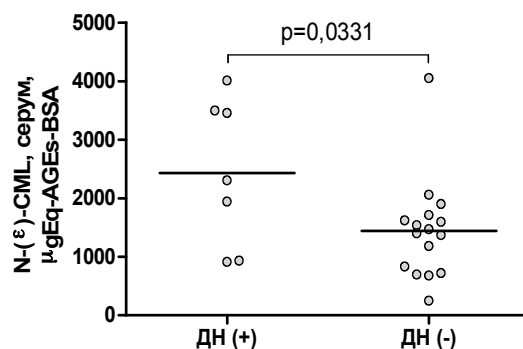


**Фигура 44.** Сравнителен анализ на серумните нива на фруктозамина при пациенти с диабетна нефропатия и при пациенти без диабетна нефропатия

### 5.1. Фруктозамин в серум и диабетна нефропатия

При пациентите с диабетна нефропатия (ДН) ( $n=7$ ) средното ниво на фруктозамин в серума е  $2,313 \pm 0,686$  mM и е значимо по-високо от средното ниво на фруктозамин в серума при пациентите без ДН ( $1,777 \pm 0,353$  mM) (Mann-Whitney test, one-tailed,  $p=0,0244$ ) (Фиг. 44).

Сред пациентите с патологично повишени нива на фруктозамин в серума ( $n=11$ ), 5 (45,5%) са с ДН, а сред пациентите с референтни нива на фруктозамин в серума ( $n=12$ ), с ДН са само 2 (16,7%). Това разпределение показва, че въпреки разликата в честотите на ДН при двете групи пациенти, наличието на патологично повишени нива на фруктозамин в серума на пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided,  $p=0,1483$ ).



**Фигура 45.** Сравнителен анализ на серумните нива N-(ε)-CML при пациенти с диабетна нефропатия и при пациенти без диабетна нефропатия

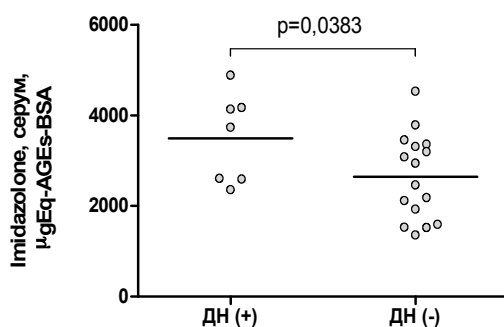
**Таблица 13.** Разпределение на пациентите със ЗД според серумните нива на N-(ε)-CML и наличието на липсата на ДН.

Общо пациенти (N=23)	Наличие на ДН	Липса на ДН	Общо
Повишени нива на N-(ε)-CML	4	1	5
Референтни нива на N-(ε)-CML	3	15	18
Общо	7	16	23

### 5.2. N-(ε)-CML в серум и диабетна нефропатия

При пациентите с ДН средното ниво на N-(ε)-CML в серума е  $2433,0 \pm 1256,0$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$  и е значимо по-високо от средното ниво на N-(ε)-CML в серума на пациентите без ДН, което е  $1441,0 \pm 858,5$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$  (Mann-Whitney test, one-tailed,  $p=0,0331$ ) (Фиг. 45).

Сред пациентите с патологично повишени нива на N-(ε)-CML в серума ( $n=5$ ), с ДН са 4 (80,0%), докато сред пациентите с референтни нива на N-(ε)-CML в серума ( $n=18$ ), с ДН са само 3 (16,7%) (Табл. 13). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в серума на пациентите със ЗД статистически значимо определя наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided,  $p=0,0173$ ) с чувствителност (Se) 57,1%, специфичност (Sp) 93,8%, позитивна предиктивна стойност (PPV) 80,0%, негативна предиктивна стойност (NPV) 83,3%, относителен риск (RR) 4,8 и съотношение на шансовете (OR) 20,0.



**Фигура 46.** Сравнителен анализ на серумните нива имидазолон при пациенти с диабетна нефропатия и при пациенти без диабетна нефропатия

### 5.3. Имидазолон в серум и диабетна нефропатия

При пациентите с ДН средното ниво на имидазолон в серума е  $3500,0 \pm 979,9$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$  и е значимо по-високо от средното ниво на имидазолон в серума на пациентите без ДН, което е  $2648,0 \pm 945,0$   $\mu\text{gEq-AGEs-BSA}$  (Mann-Whitney test, one-tailed,  $p=0,0383$ ) (Фиг. 46).

Сред пациентите с патологично повишени нива на имидазолон в серума (n=4), с ДН са 3 (75,0%), докато сред пациентите с референтни нива на имидазолон в серума (n=19), с ДН са само 4 (21,1%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на имидазолон в серума на пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided, p=0,0672).

## V. ДИСКУСИЯ:

В световен мащаб е установено, че около 43 % от пациентите, които провеждат бъбречно-заместващо лечение са диабетици. Предизвикателство представлява ранната диагноза на бъбречните заболявания при ЗД. В последните години вниманието на учените е насочено към използването на AGEs като ефективни биомаркери за ранното диагностициране на ДН. Освен това е установено, че ХБЗ при пациенти със ЗД може да не се дължи само на ДН. Увеличава се честота на НДБЗ при диабетиците, диагнозата на които се поставят чрез ПББ.

Патогенезата на ДН е многофакторна, като основния патогенетичен механизъм за развитието ѝ е неензимно гликиране на белтъците. ФА е ранен продукт на тази реакция, а N-(ε)-CML и имидазолонът са продукти на напредналата гликация. ФА е гликиран серумен протеин и е избран за метод за изследване, защото дава възможност за измерване на неензимното гликолизиране на белтъците в същия компартимент като плазмената глюкоза и може да обедини промените в кръвната захар. Повишава се при хипергликемия и дава информация за средната кръвна захар в преходните от 1 до 4 седмици, което го определя като кратковременен показател. Тъй като проучванията с ФА са относително малко и с недостатъчен брой пациенти, данните за значимостта му като маркер за гликемичен контрол са все още разнопосочни (Dorcely и сътр.). В нашето проучване установихме, че серумното ниво на фруктозамин при диабетици корелира с концентрацията на кръвната захар нагладно и е значимо по-високо от това при контролната група пациенти ( $p=0,0018$ ), което показва, че ФА може да се използва като надежден маркер за гликемичен контрол. Освен това проучването ни показа, че серумното ниво на фруктозамин при изследваните пациенти не определя наличието на диабетна нефропатия ( $p=0,1483$ ). Не открихме, проучвания сравняващи уринните концентрации на ФА при диабетици и недиабетици. Не открихме и автори които да описват зависимостта на серумните и уринните нива на ФА с възрастта на пациентите, продължителността на диабета, бъбречната функция и наличието на ДН. Нашето проучване също не доказва такива зависимости, като единствено положителна корелация се установи между фруктозамина в серума и давността на ЗД ИНЗТ. Можем да обобщим, че фруктозамина може да бъде използван като надежден маркер за гликемичен контрол, но не може да се използва като предиктор за ДН.

В няколко проучвания, проведени сред хора и експериментални животински модели е установено, че производството на AGEs се осъществява при нормалния процес на стареене, но натрупването му е по-бързо при пациенти със ЗД и неговите усложнения - диабетна нефропатия, полиневропатия, ретинопатия и катаракта (Миронова и сътр., Vlassara и сътр.). В нашето проучване установихме, че серумните нива на N-(ε)-CML са по-високи при диабетиците в сравнение с контролната група пациенти ( $p=0,02$ ). Това съответства на проучванията на Jara и сътр., Ahmed и сътр., Wautier и сътр., Yamagishi и сътр., Assad и сътр., Tsukushi и сътр. При

сравняване на нивата на N-(ε)-CML в прясна и 24-часова урина при диабетците и при контролната група пациенти не установихме статистически значима разлика между тях ( $p=0,5579$ , съотв.  $p=0,5864$ ). Това противоречи на проучването на Knecht и сътр, според което съществува слабо увеличаване на концентрацията на N-(ε)-CML в урината при диабетците спрямо тази на контролната група.

Противоречиви са данните от различните проучвания относно зависимостта между серумните и уринните нива N-(ε)-CML и възрастта на пациентите със ЗД. В нашето проучване не е открита корелационна зависимост между възрастта на диабетците и серумните и уринните нива на N-(ε)-CML, както при пациентите с ИЗТ ЗД, така и при тези с ИНЗТ ЗД. Такава зависимост липсва и в проучванията на Jaga и сътр. и Hammes и сътр. Според проучването на Schleicher и сътр. обаче с напредване на възрастта се увеличава натрупването N-(ε)-CML в серума.

С нарастването на давността на ЗД нарастват и нивата на N-(ε)-CML в серума (Цековка и сътр., Миронова и сътр.), но в нашето проучване при изследваните пациенти не установихме корелационна зависимост между тези показатели, което се доказва и от проучванията на Shimoiki и сътр. и Hammes и сътр. Проучването на Jaga и сътр. обаче открива положителната корелационна зависимост между стойностите на N-(ε)-CML в серума и продължителността на ЗД.

В литературата не открихме проучвания, които да покажат зависимостта на нивата N-(ε)-CML в урината с възрастта и продължителността на диабета.

Многочислените изследвания са фокусирани на въздействието на бъбречната функция върху нивата на AGEs. Според проучването на Wagner и сътр., Yamagishi и сътр., Lieuw-A-Fa и сътр. влошената бъбречната функция е причина за нарушена екскреция на N-(ε)-CML и за натрупването им в плазмата. Shimoike и сътр. твърдят, че повишената серумна концентрация на AGEs при ДН се дължи главно на намалено им почистване от бъбрека, а не на повишено им производство в хода на хипергликемия или оксидативен стрес. Това се потвърждава и от нашето проучване според което патологично повишени нива на N-(ε)-CML в серума статистически значимо определя наличието на декомпенсирана бъбречна функция ( $eGFR < 60$  mL/min) при пациентите със ЗД ( $p=0,0137$ ). Може да обобщим, че серумните концентрации на N-(ε)-CML в голяма степен зависят от скоростта на гломерулната филтрация. Множественият стъпаловиден регресионен анализ подчертава значителна зависимост между стойностите на AGEs в урината и изчисления крeатинин клирънс. Въз основа на това е прието, че екскрецията на AGEs с урината се влияе главно от бъбречната функция. Според изследванията на Wagner и сътр. е налице намалена екскреция с урината на N-(ε)-CML при пациенти с диабет и нарушена бъбречна функция. Morgos и сътр. описват значително по-високо ниво на N-(ε)-CML в урината при пациенти със ЗД тип 2 и изявена нефропатия. Според нашето

проучване липсва статистическа значима разлика между уринните нива на N-(ε)-CML при диабетици със запазена бъбречна функция и при тези с влошена бъбречна функция.

Продължителното задържане на гликирани продукти в циркулацията поради тяхната засилена продукция или недостатъчна екскреция може да бъде допълнителен патологичен фактор в патофизиологията на диабетната нефропатия. Kushimого и сътр. в своето проучване проследяват серумните и тъканните нива на N-(ε)-CML за период от 6 месеца при експериментални животни и установяват, че натрупването на N-(ε)-CML предшества промените в гломерулните компоненти на екстрацелуларния матрикс в хода на ДН, което предполага, че гликирането може да бъде една от основните причини за диабетна гломерулосклероза. Участието на AGEs в патогенезата на ДН се потвърждава и от проучвания проведени при диабетици, като много автори доказват ролята на серумните нива на N-(ε)-CML като полезен индикатор за ДН (Yamagishi и сътр., Schleicher и сътр., Mariska). Значението на този показател като маркер за ДН се потвърждава и от нашето проучване, според което наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в серума на пациентите със ЗД определят 4.8 пъти по-висок риск за диабетна нефропатия ( $p=0,0173$ ). Резултатите от друго проучване, проведено от Coughlan при експериментални животински модели и при пациенти със ЗД обаче показват, че уринните, а не плазмените нива на N-(ε)-CML са асоциирани с диабетна нефропатия. Това не се потвърждава в резултатите от нашето проучване според което наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в урината на пациентите със ЗД не определя наличието на ДН.

Имидазолонът е друг краен продукт на гликирането, който се образува в условия на хронична хипергликемия. Според повечето клинични проучвания серумните му нива са по-високи при диабетиците в сравнение с недиабетиците (Niwa и сътр., Wautier и сътр., Tsukushi и сътр.). В нашето проучване не е открита значима разлика между серумните нива на имидазолон в двете групи пациенти ( $p=0,6729$ ). Най-вероятно, причината за това е краткия полуживот и относителната нестабилност на хидроимидазолоните. Не изключено причината за ниските му серумни нива да се на дължи на факта, че по-голяма част от този продукт се натрупва в еритроцитите и тъканите. В свое проучване Niwa и сътр. установяват, че при диабетици еритроцитните нива на 3-деоксиглюкозан, прекурсор на имидазолон са по-високи в сравнение с тези в серума. Освен това те провеждат имунохистохимично изследване на бъбречна тъкан при пациенти с ДН и при здрави контроли като установяват повишено локализиране на имидазолон в нодуларните лезии и бъбречните артериални стени при пациентите с диабетна нефропатия, като не откриват такива отлагания при здравите индивиди. Те достигат до извода, че имидазолонът е ключов AGEs в тъканите. Тези резултати потвърждават водещата роля на имидазолон в патогенезата на ДН. В това проучване на Niwa и сътр. са установени и повишени серумни нива на 3-дезоксигликозон и имидазолон при пациенти с уремия, което се дължи на намалената редуктазна активност на 3-дезоксигликозон в

бъбреците при пациенти с уремия. Използване на инхибитор на алдолазна редуктаза води до понижаване на нивата 3-дезоксигликозон, респ. на имидазолон. По този начин могат да бъдат редуцирани нивата на AGEs и да се забави прогресията на усложненията на ЗД.

В нашето проучване не е открита корелационна зависимост на този продукт с възрастта на диабетите, продължителността на диабета и бъбречната функция. В литературата не открихме проучвания, в които да са проучени тези зависимости.

Според нашето проучване при пациентите с ДН серумното ниво на имидазолон е по-високо от това при пациенти без ДН ( $p=0,0383$ ). Въпреки това наличието на патологично повишени нива на имидазолон в серума на пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия ( $p=0,0672$ ). Това показва, че имидазолон не може да бъде надежден маркер за диабетна нефропатия, въпреки повишените му серумни нива при пациенти с ДН.

Образуваните в условия на хипергликемия AGEs имат антигенни свойства. Съществуването на AGEs *in vivo* е способно да действа като имуноген, който може да предизвика образуването на автоантитела. Доказано е, че anti-AGEs се откриват в серума на пациенти с диабет. В проучванията си Mashitah MD и сътр., Vay и сътр. са установили повишени титри на анти-CML антитела (IgG - изотип) в серуми на пациенти с диабет в сравнение с контролите. В нашето проучване също се установи, че диабетите имат по-високи стойности на anti-AGEs в сравнение с недиабетици. Проучвания на Buongiorno AM и сътр., Turk Z и сътр. обаче докладват за обратното състояние, т.е. по-ниски титри при anti-AGEs при диабетите, отколкото при нормални контроли. За да обяснят този парадокс, авторите предполагат, че циркуляционните anti-AGEs са или уловени от тъканно обвързани AGEs или уловени в имунни комплекси, затрудняващи тяхното определяне.

Сравнително малко проучвания описват зависимостта на anti-AGEs с възрастта на диабетите и продължителността на диабета. Единствено Vay и сътр. установяват в своето проучване, че наличието на анти-CML IgG при диабетите не се влияе от възрастта и продължителността на ЗД. Липсата на такава корелационна зависимост е потвърдена и в нашето проучване. В литературата не намерихме проучвания показващи зависимостта на серумните концентрации на anti-AGEs с наличието на ДН.

В заключение може да обобщим, че нарастващата честота на ЗД и неговите усложнения е предпоставка за откриването на надежден неинвазивен показател за ранна им диагноза. Според нашето проучване N-(ε)-CML може да бъде такъв индикатор за пациентите с ДН. Въпреки, че серумното ниво на имидазолон е по-високо при пациентите с ДН, той все още не може да бъде използван като диагностичен маркер. Необходимо е изследване на AGEs при по-голям брой пациенти за да се докажат тези закономерности.

Диагнозата ДН обаче често е свръхдиагностицирана, защото се поставя въз основа на клинични критерии, като по този начин пациенти с потенциално друго дифузно бъбречно

заболяване често се пренебрегват. Разпространението на недиабетното бъбречно заболяване в публикувани проучвания варира в широки граници от 10% до 85%. В нашето проучване честота е 79,4%, което е най-близко до резултатите на подобни проучвания, проведени от Soni и сътр. в Южна Индия -72.5%, Pham и сътр. в САЩ - 72.5% , Chang и сътр. в Корея – 63.9% ; Zhuo и сътр. в Китай – 82.9%, но е различна в сравнение с други проучвания, при които разпространението на НДБЗ е около 12.3–33.3% (Chawarnkul и сътр., Christensen и сътр.). Голямото колебание в докладваното разпространение на НДБЗ вероятно се дължи на различни критерии за подбор на пациенти за ПББ и на географски и етнически различия. Интерес предизвиква фактът, че в нашето проучване ДН е доказана само при 20,6% от биопсираниите болни, вероятно поради спазване на индикациите за провеждане на манипулацията при диабетници.

Разнопосочни са данните за типът на морфологичните изменения, отчетени с ПББ при диабетниците. Според азиатските проучвания (Li и сътр., Yuun и сътр.) IgA нефропатията е най-разпространеното НДБЗ, а според проучвания проведени сред предимно европейски популации, САЩ и в Нова Зеландия (Arif и сътр., Fiorentino и сътр., Erdogmus и сътр., Liu и сътр.), това е ОСГС. Според нашето проучване, най-честото бъбречно заболяване сред диабетниците, различно от ДН е хроничният интерстициален нефрит, последвано от мембранозната нефропатия. Интересен е фактът, че при част от пациентите в нашето проучване са диагностицирани системни заболявания – 4 % са с лупусна нефропатия, 2% са с васкулит. Настоящото проучване дава основание да се обсъди допълнителна индикация за провеждане на ПББ при диабетници за изясняване на бъбречните промени при системни заболявания като колагенози, васкулит, амилоидоза, миеломна болест и др.

Поради факта, че все още няма общо становище за критериите за провеждане на бъбречната биопсия при пациентите със ЗД е важно да се установят клиничните индикатори за разграничаване на ДН и НДБЗ.

Давността на ЗД е важен фактор, определящ развитието на ДН, като увеличаването на продължителността на заболяването увеличава риска от нефропатията. В проучванията на Vermejo и сътр., Horvatic и сътр., Prakash и сътр. се установи, че кратката продължителност на ЗД предполага развитие на НДБЗ. Това се потвърждава и в нашето проучване, като според получените данни давност на захарния диабет над 6 години е свързана с приблизително 3 пъти по-висок риск за установяване на хистологични данни за ДН. Трябва да се има предвид обаче, че наличието на клинични данни за ДН не изключва НДБЗ и при подозрение е необходимо провеждането на ПББ.

Според редица проучвания (Horvatic и сътр., Einbinder и сътр.) друг фактор, който определя значимо развитие на хистологични промени, характерни за ДН, са изчерпаните инсулинови резерви. Това се потвърждава и от данните в нашето проучване, според които

зависимостта от инсулинолечение е свързано с приблизително 4,5 пъти по-висок риск от развитие на хистологични промени, характерни за ДН.

Значението на протеинурията и на бъбречната функция като фактори, определящи развитието на НДБЗ, все още не е напълно уточнено. Съществуват вариации в анализите за значението на протеинурията като диференциален индикатор на ДН от НДБЗ. Според проучванията на Agif и сътр., Vermejo и сътр., Wu и сътр. по-ниската протеинурия се асоциира с НДБЗ, което е противоположно на проучванията на Sharma и сътр., които свързат по-високата протеинурия с НДБЗ. Разнопосочни са данните на авторите за значението на бъбречната функция (определена чрез нивата на серумния креатинин и/или чрез скоростта на гломерулна филтрация) като индикатор на НДБЗ. Проучванията на Wu и сътр., Castellano и сътр., Ghani и сътр. показват асоциация на НДБЗ с по-ниски нива на серумния креатинин, докато Sharma и сътр., Tan и сътр. констатират това за по-висок серумен креатинин. Разнообразните резултати по отношение на серумния креатинин и протеинурията като предиктори за НДБЗ, най-вероятно са дължат на различните индикации за провеждане на биопсия в проведените проучвания. Според данните от настоящето проучване наличието на хистологични данни за ДН при пациенти със ЗД е свързано с по-ниски стойности на гломерулната филтрация и по-високи стойности на протеинурията.

Редица проучвания показват, че ДР може да бъде важен белег за разграничаване на ДН от НДБЗ (Vermejo и сътр., Horvatic и сътр., Kotlarsky и сътр., Yenigun и сътр., Wilfred и сътр.). Според данните от нашето проучване ДР значимо определя наличието на ДН с висока специфичност, като ретинопатията е свързана с около 8 пъти по-висок риск от установяване на хистологични данни за ДН. Не винаги обаче, липсата на очни промени отхвърля възможността за ДН и при определени индикации точната характеристика на бъбречните промени би следвало да се уточни с ПББ.

В литературата не открихме проучвания, които да показват ролята на ДППП като маркер за разграничаване на ДН от НДБЗ. Според данните от нашето проучване ДППП не е свързана с установяване на хистологични данни за ДН и не може да бъде надежден маркер за разграничаване на ДН от НДБЗ.

Значението на артериалната хипертония и гликемията като фактори определящи НДБЗ все още не са уточнени. Нашето проучване показва, че те не могат да се свържат с наличието или липсата на хистологични данни за ДН, което съответства на проучванията на Ghani и сътр.

Хематурията е рядка при ДН, но съпътства доста от гломерулните заболявания. Това показва, че тя може да бъде полезен диференциален индикатор на НДБЗ и ДН. Това се потвърждава от резултатите от проучванията на Agif и сътр., Vermejo и сътр., Liu и сътр., Castellano и сътр. Според нашето проучване уринният седимент не определя наличието или липсата на хистологични признаци за диабетна нефропатия, което съответства на проучванията на Erdogmus и сътр. и Ghani и сътр.

Диагнозата ДН, поставена само по клинични признаци, често е погрешна. ПББ има своето място при част от болните със ЗД, тъй като с манипулацията могат да се установят недиабетни увреждания на бъбреците.

Може да обобщим, че ранна диагноза на бъбречните заболявания при захарен диабет предоставя възможност за по-ефективно терапевтично поведение. За ранно диагностициране на диабетна нефропатия могат да бъдат използвани AGEs като неинвазивни биомаркери, а последващото инхибиране на образуването им е опит за повлияване на нейното развитие. Отдиференцирането на недиабетното бъбречно заболяване от ДН чрез ПББ, дава възможност за тяхното лечение и подобряване прогнозата на ХБЗ.

## **V. ОБОБЩЕНИ ОСНОВНИ ИЗВОДИ:**

1. Морфологичните изменения при пациенти със захарен диабет са хетерогенни.
2. Висока е честота на недиабетното бъбречно заболяване при диабетичите.
3. Най-честото недиабетно бъбречно заболяване е интерстициалния нефрит, последвано от мембранозната нефропатия.
4. Давността на захарния диабет определя развитието на хистологични промени, характерни за диабетна нефропатия, като давност на захарния диабет над 6 години е свързана с приблизително 3 пъти по-висок риск за установяване на хистологични данни за диабетна нефропатия.
5. Изчерпаните инсулинови резерви при пациентите със ЗД определят значимо развитието на хистологични промени, характерни за диабетната нефропатия и са свързани с приблизително 4,5 пъти по-висок риск от развитие на хистологични промени, характерни за диабетна нефропатия.
6. Наличието на диабетна ретинопатия значимо определя наличието на диабетна нефропатия с висока специфичност, като ретинопатията е свързана с около 8 пъти по-висок риск от установяване на хистологични данни за диабетна нефропатия.
7. Серумните нива на фруктозамина и имидазолонът могат да бъдат използвани като маркер за гликемичен контрол.
8. С ограничаване на бъбречната функция нарастват серумните нива на N-(ε)-CML, като патологично повишените му нива определят 3 пъти по-висок риск от влошена бъбречна функция.
9. Наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в серума на пациентите със ЗД определят 4.8 пъти по-висок риск за диабетна нефропатия.

## **VI. ОСНОВНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **1. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР:**

1. За първи път е проучена честота и типа на морфологичните изменения при пациентите със захарен диабет, които са имали показания за провеждане на пункционна бъбречна биопсия сред българската популация. (С научно-теоритичен и научно-практичен характер.)

2. За първи път са изследвани продукти на ранното и напреднало неензимно гликиране и антителата насочени срещу AGEs сред българската популация. (С научно-практичен характер.)

3. За първи път комплексно са проучени връзките на продуктите на ранното и напреднало неензимно гликиране и антителата насочени срещу AGEs с клинично-лабораторните показатели при пациенти със захарен диабет. (С научно-теоритичен и научно-практичен характер.)

4. За първи път комплексно е проучена диагностичната стойност на продуктите на ранното и напреднало неензимно гликиране и антителата насочени срещу AGEs сред пациентите със захарен диабет. (С научно-практичен характер.)

### **2. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР:**

1. Потвърдена е диагностичната роля на пункционната бъбречна биопсия при пациентите със захарен диабет.

2. Проучени са основните клинично-лабораторните показатели при пациенти с хистологични данни за недиабетно бъбречно заболяване, диабетна нефропатия и насложено недиабетно бъбречно заболяване при диабетна нефропатия.

3. Чрез проучване на наличието на ранни и напреднали продукти на гликирането и антитела насочени срещу AGEs и техните връзки с останалите клинично-лабораторни параметри се демонстрира ролята на неензимното гликиране в патогенезата на диабетната нефропатия.

## VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. **Б. Василева**, В. Шурлиев, В. Василев, Я. Коларска, В. Лазаров, Б. Делийска Значение на ПББ при пациенти със запален диабет; Нефрология, Диализа, Трансплантация; 2019, 2, 26-32
2. **Б. Василева**, Б. Делийска; Достатъчен ли е гликираният хемоглобин за проследяване на гликемичния контрол при болни с различен стадий на хроничното бъбречно заболяване; Нефрология, Диализа и Трансплантация; 2017, 23,3, 5-11
3. Kolarska Y, Kamenov As., **Vasileva B.**, Trifonova D., Nanchev N, Delijska B. Cardiovascular events in pre-dialysis and dialysis patients with hyperuricemia; International journal of current research; 2017 (03) 52759-52762 [IF: 0.10]