

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ, МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО НЕФРОЛОГИЯ

УМБАЛ „ЦАРИЦА ЙОАННА-ИСУЛ“ ЕАД, СОФИЯ

КЛИНИКА ПО НЕФРОЛОГИЯ

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

Съдържание:

Използвани съкращения.....	4
I. Увод.....	6
II. Литературен обзор.....	8
1. Исторически преглед.....	10
2. Епидемиологични данни.....	10
3. Патогенеза и класификация на захарния диабет.....	10
4. Определение за диабетна нефропатия.....	12
5. Патогенеза на диабетната нефропатия.....	13
5.1. Хемодинамични фактори.....	14
5.2. Метаболитни фактори.....	14
5.2.1. Полиолен /ензимен/ път.....	14
5.2.2. Неензимно гликиране на белтъците.....	15
5.2.2.1. Образуване на продуктите на напреднало гликиране (AGEs).....	15
5.2.2.2. AGEs при диабетна нефропатия и при други микроваскуларни усложнения.....	21
5.3. Оксидативен стрес.....	32
6. Патоанатомия.....	32
6.1. Морфологични изменения при диабетна нефропатия.....	33
6.2. Идиопатична нодуларна гломерулосклероза.....	39
6.2.1. Честота.....	39
6.2.2. Патогенеза.....	40
6.2.3. Морфологична находка.....	41
6.2.4. Прогноза.....	41
7. Клинични и лабораторни признаци на на диабетната нефропатия.....	42
8. Маркери за проследяване на гликемичния контрол при пациенти със ХБЗ.....	45
9. Недиабетно бъбречно заболяване.....	50
9.1. Честота.....	50
9.2. Преглед на аутопсионните находки.....	51
9.3. Патогенетични механизми на НДБЗ при диабетици.....	52
9.4. Индикации за ПББ при диабетици.....	52
9.5. Морфологични находки при диабетици.....	55
9.6. Анализ на клинично-лабораторните показатели при диабетици според различните проучвания.....	56
9.7. Прогноза.....	61
III. Цел и задачи.....	62
IV. Материал и методи.....	63
A. Материал и методи I.....	63
1. Материал.....	63
2. Методи.....	65
2.1. Клинични изследвания.....	65
2.2. Антропометрични методи.....	65
2.3. Стандартни лабораторни изследвания.....	65
2.4. Хистоморфологични изследвания.....	69
2.5. Други клинични методи.....	70
2.6. Дизайн на изследването.....	72

2.7. Статистически методи за обработка на резултатите.....	72
Б. Материал и методи II	74
1. Материал.....	74
2. Методи.....	76
2.1. Клинични изследвания.....	76
2.2. Антропометрични методи	76
2.3. Стандартни лабораторни изследвания	76
2.4. Количествено определене на продуктите на гликиране и Anti-AGEs	79
2.5. Други клинични методи	81
2.6. Дизайн на изследването	83
2.7. Статистически методи за обработка на резултатите	83
V. Резултати	84
1. Анализ на честота и типът на морфологичните изменения при пациенти със ЗД	84
2. Анализ на основните клинични и лабораторните показатели при пациентите със ЗД.....	88
3. Анализ на нивата на продуктите на неензимно гликиране и anti-AGEs при пациенти с диабет и контроли.....	102
4. Анализ на връзките на нивата на продуктите на гликиране и anti-AGEs с клинично-лабораторни показатели при пациенти със ЗД и ХБЗ.....	107
4.1. Продукти на неензимно гликиране и възраст на пациентите.....	107
4.2. Продукти на неензимно гликиране и давност на захарния диабет.....	109
4.3. Продукти на неензимно гликиране и бъбречна функция.....	112
4.4. Продукти на неензимно гликиране и протеинурия.....	119
4.5. Продукти на неензимно гликиране и гликемия	123
5. Определяне значимостта на продуктите на неензимното гликиране и anti-AGEs като неинвазивен диагностичен маркер за диабетна нефропатия.....	130
VI. Дискусия.....	138
VII. Обобщени основни изводи.....	146
VIII. Основни приноси на дисертационния труд.....	147
1. Приноси с оригинален характер.....	147
2. Приноси с потвърдителен характер.....	147
IX. Използвана литература.....	148
X. Списък на публикациите във връзка с темата на дисертационния труд.....	162

Използвани съкращения:

АТ II – ангиотензин II

ГБМ – гломерулна базална мембрана

ДББ – Диабетна бъбречна болест

ДН – диабетна нефропатия

ДКА – Диабетна кетоацидоза

ЗД - Захарен диабет

ЗД тип 1 – Захарен диабет тип 1

ЗД тип 2 – Захарен диабет тип 2

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс

МДА - малондиалдехид

ИНГ – идиопатична нодуларна гломерулосклероза

ИФТА – интратубуларна фиброза и тубулна атрофия

НДБП – недиабетни бъбречни промени

НДБЗ – недиабетно бъбречно заболяване

ПББ- пункционна бъбречна биопсия

СЗО – Световна здравна организация

ТБМ – тубулна базална мембрана

ТБН – Терминална бъбречна недостатъчност

ХБЗ – Хронично бъбречно заболяване

ФА – фруктозамин

AGEs – продукти на напредналото гликиране

Anti-AGEs- антитела срещу AGEs

CTGF – съединително-тканен растежен фактор

MRPs – продукти на реакцията на Maillard

VEGF – съдово-ендотелен растежен фактор

GG – glycation gap.

GFR – гломерулната филтрация

FAs – фруктозамини

HbA1c – гликиран хемоглобин

HSA – Човешки серумен албумин

MCP-1 - моноцитен хемоатрактант протеин-1

MGN – метил-глиоксал

N-(ε)-CML – N-(ε) –карбосиметиллизин

PDGF - растежен фактор, произхождащ от тромбоцити

RAGE – рецептори на продуктите на напреднало гликиране

ROS – реактивни кислородни видове

TNF-α - тумор некротизиращ фактор-α

TGF-β – трансформиращ растежен фактор-β

3-DG - 3-дезоксиглюкозони

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 предразположеност, 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 аминокислотни 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 диабетиците. 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 диабетиците 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 нейното терапевтично повлияване.

II. Литературен обзор

1. Исторически преглед

Захарният диабет (ЗД) е болест, известна на човечеството от поне 3000 години. Първото описание на диабетното състояние е дадено още в така наречения папирус Ebers (1500-1300 г. пр. н.е). Диабетът се споменава и в древната арабска и еврейска книжнина. През I-ви век след н.е гръцкия лечител Aretaeus от Кападокия описва мистериозно заболяване, което нарича „diabetes”. В това време диабетът се е разглеждал като заболяване, при което организма губи способността да задържа течности. Представата за това патологично състояние е произхождала от основните симптоми на диабета – обилно уриниране (полиурия) и неутолима жажда (полидипсия). Древните лечители обаче не могли да достигнат до обяснение за същността на явлението и до причината за заболяването. Индийските лекари от 7 век първи са документирали един от най-важните симптоми на болестта, а именно че урината на диабетика има сладък вкус. Древните индийци забелязали, че урината на болните от диабет привлича мравките и я нарекли „болест на сладката урина“. Древните корейци, китайци и японци също определят това състояние като „болест на сладката урина“. В Европа това е било открито стотици години по-късно.

През XVII век английският лекар Thomas Wills установява, че урината при диабетичите е сладка като мед, чрез нейната дегустация. Това е върховен пример за тестване до леглото на болния, което води до диагностицирането на пациента като диабетик, ако урината му е "медена". Това дава и пълното наименование на заболяването, с което е известно и до днес – „diabetes mellitus”. Симптомите на ЗД са познати от векове, но истинското разбиране за причините за това състояние и за възможностите за клиничното му лечение е развито едва през миналото столетие. През 1869 г. 22-годишният Paul Langerhans, работещ по докторската си дисертация, идентифицира клетките, които по-късно са наречени "островчетата на Лангерханс". През 1889 г. Josef von Mering и Oskar Minkowski провеждат експерименти с кучета и установяват, че отстраняването на панкреаса води до развитието на ЗД. Едни от големите заслуги в изследването на етиологията, патогенезата, епидемиологията и причинно-следствените връзки по отношение на хранене и начин на живот при ЗД има руският учен Мечников. Негов последовател – руският учен Соболев установява

вътрешно-секреторната функция на инсулиновия апарат и набелязва пътя за получаване на инсулинови препарати. През 1919 г. sir Edward Arlet Sharpay – Scheffer предположил, че диабетът се предизиква от недостиг на химично вещество, отделяно от Лангерсансовите острови на задстомашната жлеза. Той нарекъл това вещество инсулин от латински *insula*, което означава остров. Ендокринната функция на задстомашната жлеза и ролята на инсулина за развитието на диабета били потвърдени през 1921 г. от Frederick Banting и Charles Best. Те повторили експеримента на von Mering и Minkovski, показвайки, че симптомите на диабет при куче с отстранен панкреас могат да бъдат премахнати, чрез вкарване в организма му на екстракт от Лангерхансови острови от панкреаса на здраво куче. Frederick Banting, Charles Best и техните сътрудници пречистили инсулин, отделен от панкреаса на едър рогат добитък. С откриването и изолирането на инсулина се поставила нова историческа ера в лечението на диабета. На 11.01.1922 г. 14-годишния Leonard Thompson станал първият човек на който е приложен пречистен инсулинов екстракт. През 1923 г. Banting и Best получават Нобелова награда за откритието си. Производството на инсулин и приложението му за лечение на ЗД започнали бързо да се развиват.

През 1935 г. Roger Hinsworth описал двата типа диабет: ЗД тип 1 „инсулин чувствителен“ - с абсолютна инсулинова недостатъчност и ЗД тип 2 „инсулин нечувствителен“ - с относителна инсулинова недостатъчност. Това откритие отворило нови възможности за тяхното лечение. През 50-те години на ХХ век били разработени сулфанилуреините препарати за лечение на ЗД тип 2. През 1955 г. англичанинът Sanjer установил напълно първичната структура на инсулина – пептид изграден от 51 аминокиселини. През 1963 г. и 1965 г. в САЩ от Р. Kostoyanis и Н. Cahn била осъществена и синтезата на човешкия инсулин.

През 1936 г. Paul Kimmelsteil и Clifford Wilson описват за първи път характерните нодули за диабетната нефропатия (ДН). През 1942 г. Fahr съобщава за дифузно разнообразие на диабетната гломерулосклероза и това е първото описание в английската литература, но не е общо прието като съществена и специфична част от диабетната лезия, докато тези промени не са описани от Thompson през 1950 г. Bell предлага, че терминът „Kimmelsteil-Willson“ лезия трябва да бъде ограничен до нодуларната интракапилярна гломерулосклероза [4, 86, 175].

2. Епидемиологични данни

Захарният диабет представлява един от най-важните здравни проблеми в света. През последните години глобалното разпространение на ЗД тип 2 достигна епидемични размери [9, 38]. Световната здравна организация (СЗО) предвижда увеличение на глобалното разпространение на ЗД от 2,8% през 2000 г. до 4,4% през 2030 г. Тази оценка показва, че през 2030 г. ще има 366 милиона възрастни с диабет. Най-голямо увеличение на разпространението му се очаква в Близкия изток, Африка (на юг от Сахара) и Индия. Според друго глобално епидемиологично проучване през 2013 г. 382 милиона души са имали диабет, като честотата се очаква да нарасне до 592 милиона до 2035 г. [38, 76]. В Съединените щати, например между 2000 г. и 2050 г. се предвижда 165% увеличение на разпространението на ЗД [76]. Повишеното му разпространение води до увеличаване на броя на макро- и микроваскуларните усложнения, като коронарна болест на сърцето, инсулт, зрително увреждане, диабетна бъбречна болест (ДББ) и бъбречно заболяване в краен стадий (ТБН) [103].

Диабетът е водеща причина за хронично бъбречно заболяване (ХБЗ) в световен мащаб [15, 38, 47]. Почти 43% от диабетици в САЩ имат микроалбуминурия, маркер на прогресията до ХБЗ. Според данните от националното проучване за изследване на здравето и храненето (NHANES), 39% от случаите на бъбречна недостатъчност са в резултат на ДББ [38, 76]. Пациентите с диабет и ХБЗ имат повишен риск от смъртност, свързана със сърдечно-съдови заболявания и усложнения в хода на бъбречна недостатъчност. Според изчисленията на СЗО смъртните случаи, свързани с диабета, ще се удвоят от 2005 г. до 2030 г. [38, 149]. С нарастващото разпространение на ХБЗ, разходите за терапевтичното му повлияване се превръщат в проблем на общественото здраве. През 2013 г. над 30 милиарда долара от разходите на Medicare са изразходвани за лечение на терминален стадий на бъбречните заболявания (ТБН), като 14 милиарда от тях са похарчени за пациенти с ТБН, развила се в хода на ДББ [76]. Тези резултати показват, че са необходими нови по-ефективни стратегии за превенция, диагностициране и терапия на ДББ. За да се разработят нови терапевтични стратегии, от първостепенно значение е по-точно и пълно разбиране на механизмите на увреждане на бъбреците и възстановяване при диабет [15, 76, 133].

3. Патогенеза и класификация на ЗД:

В развитието на ЗД участват няколко патогенетични процеса. Те варират от аутоимунно разрушаване на β -клетките на панкреаса с последващ инсулинов дефицит до аномалии, които водят до резистентност към инсулиновото действие. В основата на аномалиите в метаболизма на въглехидрати, мазнини и протеини при диабет се крие недостатъчното действие на инсулина върху прицелните тъкани, което е резултат от неадекватна секреция на инсулин и/или намаляване на тъканните реакции към него. Увреждането на инсулиновата секреция и дефектите в действието му често съществуват едновременно при един и същ пациент и често не е неясно коя е основната причина за хипергликемията [6].

Според Американската диабетна асоциация (АДА) диабетът може да се класифицира в няколко групи:

1. ЗД тип 1 – патогенезата му е свързана с аутоимунна деструкция на β -клетки на панкреаса, което обикновено води до абсолютен дефицит на инсулин. Маркерите за имунната деструкция на β -клетките включват аутоантитела към островни клетки, аутоантитела към инсулин, аутоантитела към GAD (GAD65) и аутоантитела към тирозин фосфатази IA-2 и IA-2 β . Едно или обикновено няколко аутоантитела присъстват при 85–90% от хората, когато първоначално се установи хипергликемия на гладно. Също така, болестта има асоциация с HLA- системата, връзка с гените DQA и DQB, също и с DRB гените [6].

2. ЗД тип 2 – характеризира се с прогресивна загуба на β -клетъчна инсулинова секреция често на фона на инсулинова резистентност [6].

3. Гестационен захарен диабет (ГЗД) - ЗД диагностициран през втория или третия триместър на бременността, като при пациентката липсват данни за клиничната му изява преди забременяването [6].

4. Специфични видове диабет - дължащи се на други причини, например синдроми на моногенния диабет (като неонатален диабет и диабет на зрелостта на младите [MODY], болести на екзокринния панкреас (като кистозна фиброза и панкреатит) и лекарствени или индуциран от химикали диабет (като използване на глюкокортикоиди, при лечение на ХИВ/СПИН или след трансплантация на органи) [6].

ЗД тип 1 и тип 2 са хетерогенни заболявания, при които клиничната картина и прогресирането на заболяването могат да варират значително. Класификацията е важна за определянето на терапията, но някои индивиди не могат да бъдат категорично класифицирани като ЗД тип 1 или тип 2 по време на диагностицирането. Традиционните парадигми, че ЗД тип 2 се среща само при възрастни, а ЗД тип 1 само

при деца, вече не са точни, тъй като и двете заболявания се срещат и в двете възрастови групи. ЗД тип 1 при деца обикновено се манифестира с няколко отличителни симптоми като полиурия и/или полидипсия, а при приблизително 1/3 от тях - с диабетна кетоацидоза (ДКА). Началото на ЗД тип 1 при възрастни може да е по-променливо и да не се прояви с класическите симптоми, наблюдавани при децата. Понякога ЗД тип 2 при пациенти може да се изяви с ДКА, особено при етническите малцинства. Въпреки че при всички възрастови групи възникват трудности при разграничаването на диабетния тип, истинската диагноза става по-очевидна с времето [6].

При ЗД тип 1 и тип 2, различни генетични и екологични фактори могат да доведат до прогресивна загуба на β -клетъчна маса и/или функция, която се проявява клинично като хипергликемия. След като се появи хипергликемия, пациентите с всички форми на диабет са изложени на риск от развитие на едни и същи хронични усложнения, въпреки че степента на прогресия може е различна. Едно от тези усложнения е ДН [6].

4. Определение за ДН:

Както споменахме, ДН е най-честата причина за ХБЗ в световен мащаб. Програмата на NKF-K/DOGI (National Kidney Foundation – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) от 2012 г. дефинира понятието ХБЗ като бъбречно увреждане за 3 или повече месеци, определено като структурни или функционални бъбречни отклонения с или без намаление на eGFR, проявяващо се с патологични отклонения или с маркери на бъбречно увреждане, в това число отклонение в състава на кръвта и урината, хистологични изменения или структурни промени, отчетени с образните изследвания, или като $eGFR \leq 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ за 3 или повече месеци с или без наличие на маркери на бъбречно увреждане. Понижаването на eGFR и появата на албинурия са основните белези, които показват увреждане на бъбреците в хода на ЗД [1, 149].

Диабетната гломерулопатия е характерната лезия на пациентите с ДН. Въпреки това, само малка част от пациентите със ЗД са биопсирани. Терминът диабетно бъбречно заболяване (ДББ) е предпочитан за диабетици, при които са налице клинични признаци за бъбречно увреждане от ЗД. Терминът ДН трябва да се прилага само при пациенти със ЗД с хистологично потвърждение на бъбречно увреждане от диабета [38].

ДББ се определя като ЗД с проява на албинурия (съотношение на албумин в урината към креатинин $\geq 30 \text{ mg/g}$), нарушена скорост на гломерулна филтрация

(eGFR<60 mL/min/1.73 m²) или и двете и е предиктор за повишена смъртност при пациенти с диабет. Днес ДББ обхваща не само ДН, но също така и атеро-емболична болест, исхемична нефропатия и интерстициална фиброза, които се появяват като пряк резултат от ЗД [103].

5. Патогенеза на ДН:

Идентифицирани са няколко рискови фактори, свързани с развитието на ДН като генетична предиспозиция към ЗД, повишено кръвно налягане, повишена кръвна захар, тютюнопушене и дислипидемия. Патогенезата на ДН е сложна и многофакторна. Въпреки многобройните проучвания, данните за развитието ѝ все още са противоречиви и не напълно изяснени [76]. Лошият гликемичен контрол е считан като основен фактор, предизвикващ ДН. Някои проучвания показват вариабилност в развитието на бъбречни усложнения на ЗД въпреки сравнимия хипергликемичен контрол. Така, например едно проучване за ЗД и усложнения му показва, че близо 30% от диабетици със ЗД тип I и 25% - 40% от диабетици със ЗД тип II развиват ДН, въпреки интензивния гликемичен контрол [76, 137]. Наблюдаваната висока честота на ЗД и ДН в едни и същи фамилии потвърждава важността на генетичното предразположение към заболяването [76]. Според едно проучване, братята и сестрите на пациенти със ЗД и ДН имат четирикратно по-висок риск от развитие на ДН. Етническият произход също играе важна роля, тъй като някои раси са по-податливи на ДН, в сравнение с други [136]. Роднините на афро-американци със ЗД имат петкратно по-висок риск от развитие на ТБН, дължаща се на ДН. Освен това честотата на ТБН на глава от населението при афро-американци, испанци и индианци е значително по-висока от тази при бялата популация [76, 136]. Честотата на протеинурията сред индианците Пима също се увеличава през последните 36 години. Голямо популационно проучване показва, че близо 23% от пациентите с инцидентна диализа имат роднини с ТБН, с по-голямо разпространение сред афро-американците в сравнение с европейските американци. При фамилна анамнеза за ТБН е голяма вероятността, увреждането на бъбреците да се е развило в хода на ЗД и затлъстяване [76].

Многобройни хипергликемично-индуцирани механизми са отговорни за развитието и прогресията на ДН, като например взаимодействие между метаболитни и хемодинамични промени и генетична предразположеност, която поставя етапа на бъбречно увреждане [133].

5.1. Хемодинамични фактори:

Бъбречните хемодинамични промени са частично медираны от действията на вазоактивни хормони, като ангиотензин II (АТ II) и ендотелин-1. Те са мощни вазоконстриктори, като ефекта им е по изразен върху еферентната артериола. Това допринася за повишаване на гломерулната филтрация (eGFR), влошаване на селективната пропускливост на гломерулната базална мембрана и поява на албуминурия. Впоследствие, механичният стрес в резултат на бъбречна хиперперфузия индуцира освобождаването на цитокини (TNF- α), растежни фактори (VEGF, TGF- β 1), NO, холестерол и локални триглицериди, които допълнително индуцират натрупването на протеини в извънклетъчния матрикс, мезангиклетъчна пролиферация, задебеляване на гломерулната базална мембрана (ГБМ) и увреждане на подоцитите. Това води до влошаване на албуминурията и прогресия на ХБЗ [3, 103, 133].

5.2. Метаболитни фактори:

В условия на хипергликемия и инсулинов дефицит метаболитните пътища на глюкозата се променя в две основни насоки – ензимен и неензимен път.

5.2.1 Полиолен /ензимен/ път

Под въздействие на ензима алдозоредуктаза глюкозата се метаболизира до сорбитол, който е силно токсичен за тъканите, свободно пропускливи за глюкоза, каквито са гломерулните капилляри. Сорбитолът води до изчерпване на вътреклетъчния миоинозитол, като се нарушава отговорът на гладкомускулните клетки в гломерулните капилляри към ендогенни вазоактивни хормони - АТ-II и катехоламини. Това довежда до вазодилатация и покачване на eGFR. Натрупаният сорбитол води и до промяна на клетъчния редокspotенциал. Стига се до обедняване на клетката на НАДФ с дефицит на антиоксидантни и увеличаване продукцията на свободни радикали. Увеличава се продукцията на НАД, последвана от повишена синтеза на α -глицерол фосфат, който е прекурсор на диацилглицерола. Последният се явява активатор на протеинкиназа С и може да регулира синтезата и отстраняването на екстрацелуларни матриксни протеини (ЕЦМ) – колаген тип IV, колаген тип VI, ламинин, фибронектин. Централна роля заема

синтезът на колаген тип IV, един от най-ранните протеини в матриксната експанзия [3, 94, 120].

5.2.2 Неензимно гликиране на белтъците:

Най-важния тъканен метаболизъм е неензимното гликиране (гликозилиране) на белтъците [3, 106, 156].

5.2.2.1. Образуване на продуктите на напредналото гликиране (AGEs):

В условия на хипергликемия глюкозата влиза в неензимно взаимодействие с белтъците с кратък полуживот, като се свързва с лизинов остатък от полипептидната верига [3]. Тази реакция е описана за първи път в началото на XX век от френския химик Louis Camille Maillard и е известна като реакция на Maillard. Основната цел на френския химик е да разбере естествения начин на полимеризация на аминокиселините [156]. Гликирането протича в два основни етапа, ранен и късен. Ранният етап включва обратимо образуване на бази на Шиф между карбонилните и amino-групите на реагентите, последвано от пренареждане на базите на Шиф към значително по-стабилни алдоамини (продукти на Amadori) или кетоамини (продукти на Heyns), като до този етап реакцията има обратим характер [3, 11, 50, 106, 133, 156]. Едни от ранните продукти на реакцията на Maillard са фруктозамините (FAs), които могат да претърпят неензимно и ензимно разграждане, при което се образуват мощни реактивоспособни карбонилни съединения (деоксизони), включително 3-дезоксиглюкозони (3DG), източници на продуктите на напредналото гликиране (AGEs). Взаимодействието на FAs с ензима амадориаза води до ускорено натрупване на 3DG, което предполага, че ензимните дейности са по-скоро спонтанни реакции и участват в образуването на 3DG *in vivo*. При ниско pH 3DG може да се извлече както от фруктоза, така и от глюкоза. Въпреки това няма доказателства за директно превръщане на фруктоза в 3DG *in vivo*. Изглежда че фруктозата, като FAs, първоначално се фосфорилира преди разграждането до 3DG, най-вероятно от ензима фруктозамин 3-киназа [156]. За разлика от нея, глюкозата спонтанно се подлага на неокислително разграждане до 3DG при физиологично pH и температура [106].

Деоксизоните са 1,2-дикарбонилни съединения, които са значително по-реактивоспособни от изходните (монокарбонилни) съединения. Те са малки

молекули, които могат да дифундират от мястото, където са формирани и да атакуват аминокрупите в състава на биомолекулите [106]. Описаният до тук механизъм за формиране на AGEs е известен като класически или път на Hodge. При него AGEs са резултат, както от преобразувания на продукти на Amadori без участие на O₂, така и от тяхното окислително разграждане, при което се образуват деоскизоните. Този път се катализира от йони на преходни метали. Шифовата база, образувана по-рано в реакцията на Maillard, също претърпява окислително разграждане в присъствие на метални йони до гликоалдеhid, предшественик на AGEs – път на Namiki. В допълнение, при физиологични условия свободните монозахариди (напр. глюкозата) претърпяват автоокисление в присъствие на следи от йони на преходни метали, при което се образуват кетоалдеhиди (глиоксал и арабиноза). Те са по-реактивоспособни от глюкозата и също са прекурсори за образуване на AGEs в пътя на Wolff. От друга страна карбонилните продукти, отделяни по време на липидната пероксидация могат също да реагират с амини, като се образуват AGEs-подобни структури, наречени крайни продукти на липоксидацията (ALEs) [106, 156].

Образуването на AGEs е причина за трайни и необратими изменения в структурата и функцията на amino-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 нарушена бъбречна функция, катаракта, атеросклероза и невродегенеративните заболявания, включително болестта на Alzheimer. N-(ε)-карбоксиметиллизинът (N-(ε)-CML) и имидазолонът са основните AGEs в кръвта и тъканите, а повишените им серумни нива са описани при пациенти със ЗД и са свързани с усложненията му. При пациентите със ЗД и ХБЗ е установено приблизително два пъти повече AGEs в тъканите, отколкото при пациенти с диабет без бъбречно заболяване, причината за която се дължи на повишеното формиране и намаления клирънс на AGEs [49, 156].

N-(ε)-CML е един от най-добре характеризирани AGEs [49, 60, 156]. Първоначално е описан от Ахмед през 1985 г. и представлява най-разпространения AGE in vivo. Образува се в напреднал стадий на реакцията на Maillard и винаги съпровожда образуването на кафяви и флуоресцентни AGEs, въпреки че само по себе си то е безцветно и нефлуоресцентно вещество. Ако протеините са гликирани с рибоза или 3DG, тогава N-(ε)-CML се образува само когато реакцията се извършва при аеробни условия. Ето защо откриването на N-(ε)-CML е индикация, че протеинови модификации са настъпили в присъствието на кислород. N-(ε)-CML се образува от

различни окислителни механизми *in vitro*, включващи не само редуциращи захари. Той може също да бъде продукт на липидна пероксидация и сериново окисление и поради това N-(ε)-CML не трябва да се счита за типичен маркер за гликиране. В повечето случаи на *in vitro* гликирането N-(ε)-CML е основният продукт, открит в протеините и също е доминиращ AGEs антиген в тъканните протеини. Директното формиране на N-(ε)-CML от продуктите на Amadori чрез тяхното автоокисление е докладвано от Miki Hayashi et al. Авторите са използвали като модел на съединението на Amadori гликиран човешки серумен албумин (HSA) и са установили, че N-(ε)-CML се образува чрез топлинна обработка на гликиран HSA над 80 °C по време-зависим начин. По-нататъшно повишаване на температурата до 100 °C води до образуването на междинни съединения на гликирането - глиоксал, метил глиоксал (MGN) и 3DG. Образуването на N-(ε)-CML от HSA се инхибира в присъствието на редуциращ агент (натриев борохидрид), хелатор на йони на преходни метали (диетилентриамин пентаоцетна киселина), или реагент за улавяне на α-оксоалдехиди (аминогуанидин), което показва, че натрупването на N-(ε) -CML (AGEs) в протеините е управляем процес [156].

Хидроимидазолоните се образуват в реакция на аргинин с глиоксал, MGN и 3DG [60, 156]. Получените продукти преминават през структурна- и стерео-22 химическа изомеризация, която е обстойно проучена от Ahmed et al. Авторите откриват, че хидроимидазолоните, образувани в реакцията на аргинин с метилглиоксал (MGH), са съставени от три структурни изомера, обозначени като MGH1, MGH2 и MGH3. Реакцията на аргинин с глиоксал и 3DG дава подобни структурни изомери. Стабилността на хидроимидазолоните намалява с увеличаване на pH и всеки структурен изомер има отличителна стабилност и полуживот. Полуживотът на отделните стереоизомери на MGH се увеличава в следния ред: MG-H1 > MG-H2 >> MG-H3. При физиологични условия (pH 7.4, 37 °C) полуживотът на MGH1 е приблизително 12 дни. Ahmed et al. предполагат, че за разлика от N-(ε) - CML, хидроимидазолоните не се натрупват в дългоживеещите протеини с течение на времето *in vivo*, а по-скоро отразяват кратки епизоди на повишено гликозилиране на протеини при условия на аномално повишаване на концентрацията на α-оксоалдехидите. Авторите също така приемат, че Nω (1-карбокситетил) аргинин и Nω (1-карбоксиметил) аргинин, които са по-стабилни и открити в *in vivo* гликирани протеини, са вероятни продукти на разграждане на хидроимидазолони [106].

Повечето AGEs не се образуват при физиологични концентрации на глюкоза (до 5 mmol/L) или техните нива са доста по-ниски в сравнение с хипергликемичните

състояния. Това прави AGEs релевантен биомаркер за гликемичния статус на индивидите, който се променя с възрастта и при болестни състояния като диабет и бъбречна недостатъчност. Поради голямото си разнообразие AGEs покриват широк диапазон на концентрация *in vivo* (0.001 до 15 mmol/mol модифицирана аминокиселина) [156]. Физиологично важни AGEs са тези, които имат дълъг полуживот (N-(ε)-CML, Carboxyethyllysine-CEL и пентозидин) и/или висока концентрация (хидромидазолони). Стабилните AGEs се натрупват върху дългоживеещите протеини, такива като кожен и хрущялен колаген, протеини на човешките лещи, въпреки че N-(ε)-CML също е открит и в краткоживеещия HSA на пациенти с диабет. Хидроимидазолоните, макар и относително нестабилни, могат да се появят и в дългоживеещи протеини, като протеини на човешки лещи. Продуктите на реакцията на Maillard (MRPs), които се намират в тялото, се класифицират в три групи - MRPs като протеини (> 12 kDa), MRPs като пептиди (<12 kDa) и свободни MRPs като аминокиселини. Терминът MRPs е по-общ от AGEs и се прилага както за продуктите на ранното гликиране, така и за AGEs. Пептидните MRPs се откриват главно в плазмата на порталната вена и в урината, и са най-вероятно продукти на разграждане на гликираните протеини. Свободните MRPs се образуват по време на разграждането на протеазоми/лизозоми на гликирани клетъчни протеини, след което се освобождават в кръвния поток и се екскретират в урината, което осигурява ефективно функциониране на клетъчния протеом. Свободните MRPs могат да се появят *in vivo* и в резултат на гликиране на аминокиселини, въпреки че този източник на свободни MRPs е спорен [106, 156].

Влиянието на гликирането върху човешката физиология зависи от много фактори. Особено вредни са последствията от образуването на ковалентни кръстосани връзки в протеини, които ги правят резистентни към протеолиза [3, 106, 156]. Както ранните продукти на гликирането, така и AGEs могат да причинят увреждане чрез различни механизми, като (1) освобождаване на кислородни радикали от ранните продукти; (2) променена (блокирана) активност на ензими, рецептори и регулаторни протеини; (3) гликиране на структурни протеини; (4) увреждане на сигналните пътища, (5) увреждане на рециклирането на протеини; и (6) индуциране на имунен отговор [11, 156].

Много клетъчни рецептори са способни да свързват AGEs. Комплексът AGE – рецептор се състои от AGE-R1 (олигозахарил трансфераза-48), AGE-R2 (80kD фосфопротеин) и AGE-R3 (галектин-3). Някои рецептори, принадлежащи към различни

класове на супергрупата на рецептори за очистване (SR), също се свързват с AGEs. Това са SRA1 (SCARA1) и SRA1.1 (SRAII), SRB1 (SRBI) и SRB2 (CD36), SRE1 (LOX1), SRH1 (FEEL1) и SRH2 (FEEL2). Тези рецептори участват в детоксикацията на AGEs чрез вътреклетъчно разграждане (ендоцитоза). Най-добре характеризирани са специфичният рецептор за AGEs, наречен рецептор за продуктите на напредналото гликиране (RAGE) [50, 60, 156]. RAGE е мултилиганден рецептор на имуноглобулиновото суперсемејство, който играе ключова роля във възпалителните отговори. Неговият екстрацелуларен домен е съставен от три имуноглобулиноподобни домена - от един V (променлив) тип Ig домейн, последван от две C (константни) типа Ig домейна. RAGE също притежава трансмембранна област и цитоплазматична опашка от 43 аминокиселини. От решаващо значение за свързването на лиганда е V-домейнът, докато цитоплазматичната опашка е замесена в по-нататъшната трансдукция на уловените сигнали [156]. При физиологични условия RAGE се експресира слабо върху редица клетъчни типове и тъкани, но се наблюдава повишена експресия в местата на отлагане на лиганди. RAGE съществува и в разтворима форма (sRAGE), за която се предполага, че участва в детоксикацията на циркулиращи лиганди [60, 156].

Освен AGEs, лиганди за RAGE са провъзпалителни цитокинически медиатори от семейството S100/калгранулин, β -амилоидният пептид и амфотерин, освободени по време на клетъчна некроза. AGEs и non-AGEs лигандите се свързват с RAGE върху ендотелни клетки, неврони, гладкомускулни и имунни клетки за да активират различни сигнални пътища, включващи експресия на NF- κ B транскрипционен фактор, който играе ключова роля в регулирането на имунния отговор [60, 156]. Докато се експресира индуцирано върху Т-клетки на здрави индивиди при активиране на Т-клетъчен рецептор, RAGE се синтезира конститутивно в Т-клетките на диабетици, като е обсъдена ролята на RAGE в адаптивния имунитет. Характерно за RAGE е, че той разпознава третичните структури, а не аминокиселинните последователности. RAGE може също да привлича имунни клетки в местата на възпаление. Например, RAGE върху ендотелни клетки може да функционира като адхезивен рецептор, взаимодействащ с левкоцитен β 2-интегрин. Различни проучвания през последните години показват, че RAGE е отговорен за производството на AGEs чрез поддържане на оксидативния стрес и възпаление и чрез потискане на детоксикацията на MG като един от основните прекурсори на AGEs [156].

Освен клетъчните имунни отговори, AGEs могат да предизвикат хуморален имунен отговор. Прекомерното натрупване на AGEs с възрастта и при патологични

състояния корелира с повишени нива на антитела към AGEs (Анти-AGEs) [60, 156]. Гликираните протеини - хистон H2A, HSA, полилизин (PLL), IgG, ДНК и LDL са показали по-висока имуногенност при експериментални животни, отколкото негликираните аналози. Установено е, че серумите на пациенти с диабет показват по-висока свързваща активност към гликирани HSA, PLL, IgG и ДНК, отколкото към немодифицираните молекули. Освен това, пациентите с бъбречна недостатъчност с диабетна или недиабетна етиология имат по-висока активност на автоантитела спрямо N-(ε)-CML, отколкото здрави индивиди или диабетиците без бъбречна недостатъчност. Инжектирането на плъхове с *in vitro* гликиран колаген от кожа на плъх води до образуване на анти-колагенови антитела, които не реагират кръстосано с негликиран колаген. Свързването на серумни антитела с гликирания колаген се инхибира в 92%, когато реакцията се провежда в присъствието на гликиран Lys като конкурент. Този резултат показва, че гликираните Lys остатъци върху колагена са най-вероятните епитопи, уловени от анти-колагеновия антитела. Трябва да се отбележи, че серумите от стрептозотоцин-индуцирани диабетни плъхове съдържат антитела, които ясно свързват гликирания колаген [156].

Vay et al. са изследвали 289 пациенти с диабет и 120 здрави индивида за серумни антитела срещу N-(ε)-CML (анти-CML антитела). Въпреки, че са открили повишен титър на анти-CML антитела (IgG - изотип) в серуми на пациенти с диабет, в сравнение с контролите ($P < 0,0001$), няма корелация между титъра на анти-CML-антитела и гликемичния статус на пациентите. В подобно проучване, включващо 58 деца със ЗД тип I, е установено, че 19 деца са анти-AGEs антитела позитивни. За разлика от предишното проучване, авторите са открили, че титърът на анти-AGEs антитела корелира положително с някои диабетични маркери като HbA1c, микроалбуминурия и ретинопатия. Докато някои проучвания показват по-висок титър на циркулиращи анти-AGEs антитела при пациенти с диабет, отколкото при здрави индивиди, други докладват за обратното състояние, т.е., по-ниски титри при анти-AGEs антитела при диабетици, отколкото при нормални контроли. За да обяснят този парадокс, авторите предполагат, че циркуляционните анти-AGEs антитела са или уловени от тъканно обвързани AGEs или уловени в имунни комплекси, затрудняващи тяхното определяне. Това би могло да обясни липсата на корелация между титъра на серумния анти-CML антитела и гликемичния статус на пациентите в цитираното по-горе изследване [156].

AGEs са стабилни белтъци, чието натрупване продължава дълго време в тъканите. Процесът на гликиране засяга редица важни биологични молекули: хемоглобин, антитромбин III, фибриноген, фибрин, колаген, протеини на еритроцитната мембрана, на ендотелната клетъчна мембрана, на гломерулната базална мембрана, на коронарните артерии, липопротеините. Смята се, че гликирането засяга и инсулина в циркулацията, при което се губят и част от биологичните му свойства [3, 60].

5.2.2.2 AGEs при диабетна нефропатия и при други микроваскуларни усложнения (ретинопатия и полиневропатия).

Гликирането е основна причина за диабетните усложнения, едно от които е диабетната нефропатия, патогенезата на която е свързана с появата на AGEs.

В много проучвания е доказано, че при пациенти със ЗД тип 1 и тип 2, серумните и тъканните нива на AGEs са значително повишени в сравнение с недиабетните контроли. Освен това, пациентите с диабет в краен стадий на бъбречното заболяване имат почти два пъти повече AGEs в тъканите, в сравнение с пациенти с диабет без бъбречно заболяване. Повишеното образуването и намаления клирънс са отговорни за натрупването на AGEs при пациенти с ДН. Има проучвания показващи, че серумните нива на нискомолекулни AGEs, които са разградни продукти на тъканни AGEs от макрофаги, се увеличават при диабетни и недиабетни пациенти с бъбречна дисфункция. Тъй като AGEs са с ниско молекулно тегло, те се филтрират от бъбреците и след това се реабсорбират от проксималните тубулни клетки. Намалената скорост на гломерулната филтрация и увреждането на тубулоинтерстициалните клетки може също да участват в натрупването на AGEs при пациенти с диабетна нефропатия. Освен това е доказано, че N-(ε)-CML и AGEs се увеличават успоредно с тежестта на ДН при пациенти със ЗД тип 1. Съобщава се, че AGE-модифицираните нива на колаген в кожата са едни от предикторите на диабетната нефропатия и корелират с тежестта на нефропатията при пациенти с дългогодишен ЗД тип 1 [171].

AGEs се филтрират през гломерулите и се реабсорбират от бъбречните проксимални тубули. Както клирънсът, така и тубуларната реабсорбция са сложни и променливи. AGEs се натрупват в гломерулите, където увеличават експресията на колаген тип IV и ламинин в екстрацелуларните матрикси и индуцират необратими промени в структурата на протеините. В проксималния тубул те предизвикват

преждевременно стареене на клетките. AGEs са лиганди за предаване на сигнали за RAGE, който представлява трансмембранен рецептор. Това взаимодействие индуцира клетъчно увреждане чрез продуциране на реактивни кислородни видове и активиране на провъзпалителни и профибротични каскади [171].

AGEs индуцират клетъчна апоптоза и експресия на съдов ендотелен растежен фактор (VEGF) в човешки култивирани мезангиални клетки, като в случая мезангиалните клетки са аналог на перицитите в ретината. Мезангиалните клетки заемат централно анатомично положение в гломерулите и играят решаваща роля в поддържането на структурата и функцията на гломерулните капиляри. Те осигуряват структурна опора на гломерулните капиляри и модулиране на гломерулната филтрация чрез активността на гладката мускулатура. Поради това AGE-индуцираната мезангиална апоптоза може да допринесе за намаляване на част от гломерулната филтрация и ранна бъбречна дисфункция при пациенти със ЗД. Установено е, че антитела срещу VEGF подобряват филтрацията и албуминурията при експериментален диабет [171].

AGEs стимулират експресията на моноцитен хемоатрактант протеин-1 (MCP-1) в мезангиални клетки. Увеличената експресия на MCP-1 е свързана с инфилтрация на моноцити в мезангиума в ранната фаза на диабетна нефропатия. Съотношенията на MCP-1/креатинин в урината при пациенти със ЗД тип 2 и микроалбуминурия е много по-високо от това при здрави контроли, а интензивното лечение с инсулин намалява значително стойностите на съотношението MCP-1/креатинина в урината. Следователно натрупването на AGEs в гломерулите също може да бъде замесено в патогенезата на ДН чрез стимулиране на секрецията на MCP-1 мезангиални клетки [133, 171].

Освен това AGEs стимулират инсулиноподобен растежен фактор I и II, растежен фактор, произхождащ от тромбоцити (PDGF) и трансформиращ растежен фактор- β (TGF- β) в мезангиални клетки, за които е установено, че играят важна роля в патогенезата на гломерулосклерозата и тубулоинтерстициалната фиброза при ДН [133, 171]. AGEs индуцират свръхекспресия на TGF- β , както в подоцитите, така и в проксималните тубулни клетки. Наскоро, Ziyadeh et al. съобщават, че дългосрочно лечение на моделни мишки със ЗД тип 2 с блокиращи антитела срещу TGF- β води до потискане на излишната експресия на матриксния ген, гломерулосклерозата и предотвратява развитието на бъбречна недостатъчност. Проучванията показват, че AGE-индуцираната експресия на TGF- β играе важна роля в патогенезата на гломерулосклерозата и тубулоинтерстициална фиброза при ДН. In vivo е установено, че

приложението на гликиран албумин на нормални здрави мишки индуцира гломерулна хипертрофия с експресия на колаген тип IV, ламинин В1 и TGF- β . Освен това, хронична инфузия на гликиран албумин при иначе здрави плъхове води до фокална гломерулосклероза, мезангиална експанзия и албуминурия [171].

Съществуват много доказателства, че в патогенезата на ДН е включена оста AGE-RAGE. Сред различните типове AGE-рецептори, RAGE е рецепторен сигнал за трансдукция на AGEs, който би могъл да медира предизвиканите възпалителни реакции [133, 171].

Експресията на RAGE се засилва в подоцитите и в мезангиалните клетки при пациенти с ДН. Няколко проучвания със животни подкрепят ролята на RAGE в развитието и прогресирането на ДН. Установено е, че RAGE-свъръхекспресиращите диабетни мишки развиват прогресираща гломерулосклероза с бъбречна дисфункция, в сравнение с диабетни мишки, които нямат RAGE – трансген. Освен това, Wendt et al. съобщават, че диабетните хомозиготни RAGE нулеви мишки не успяват да развият мезангиална матриксна експанзия или задебеляване на гломерулната базална мембрана. В своя доклад те твърдят, че активирането на RAGE в подоцити може да допринесе до експресия на VEGF и повишено активиране на възпалителни клетки в диабетните гломерули, причиняващи албуминурия и гломерулосклероза. Освен това е съобщено, че при стрептозототин индуциран диабет при мишки, те развиват бъбречни промени, наблюдавани както при хора с ДН, като гломерулна хипертрофия, задебеляване на гломерулна базална мембрана, експанзия на мезангиален матрикс, свъръхекспресия на растежен фактор на съединителната тъкан (CTGF) и NF κ B активация. Тези бъбречни промени могат да се блокират чрез прилагане на неутрализиращи антитела срещу RAGE [171].

Взаимодействието AGE-RAGE може също да индуцира продължително активиране на NF- κ B като резултат от повишени нива на de novo синтезиран NF- κ Bp65 и по този начин би могло да допринесе за трайното увреждане на диабетния бъбрек. Ангажирането на RAGE с AGEs предизвиква окислителен стрес, като по този начин участва в ДН. ROS са цитотоксични за бъбречните клетки и предизвикват възпалителни и фиброгенни реакции при диабетните бъбреци. AGE-RAGE-медираното ROS генериране стимулира производството на про-склеротични растежни фактори като TGF- β и CTGF чрез митоген-активирана протеинова киназа (MAPK), NF κ B и/или протеин киназа C, както в мезангиалните, така и в бъбречните интерстициални клетки. Освен това, Tallas-Bonke et al. съобщават че инхибирането на

NADPH оксидаза от апоцинин предотвратява AGE-предизвикано бъбречно увреждане при експериментална ДН чрез зависим от РКC- α път. Следователно, инхибирането на произведеното от NADPH оксидаза ROS поколение, предизвикано от AGE-RAGE системата може да бъде нова терапевтична цел за лечението пациенти с диабетна нефропатия [171].

TGF- β е добре известен про-фиброгенен фактор. Той не само стимулира матриксния синтез, но също така инхибира матриксната деградация, участвайки в тубуло-гломерулната склероза при диабетици. TGF- β mRNA и протеиновите нива са значително повишени в гломерулите и тубулоинтерстициалната тъкан при животни и хора със диабет тип 1 и 2. Натрупването на AGEs в диабетните бъбреци е тясно свързано с бъбречната експресия на TGF- β . Съобщено е, че приложението на AGEs води до увеличаване на бъбречната нива на TGF- β във връзка с увеличаване на натрупването на AGEs при диабетни гризачи [171].

Oldfield et al. са съобщили, че AGEs причиняват TGF- β -индуцирано епително-мезенхимно трансдиференциране чрез взаимодействие с RAGE в нормални епителна клетки на бъбреците на плъх. Тези наблюдения показват патологичната роля на оста AGE-RAGE за появата на гломерулна склероза и тубулоинтерстициална фиброза, която е молекулна мишена за предотвратяване на ДН. Установено е, че образуването на пиридоксамин намалява бъбречния TGF- β . Съобщава се, че инхибиторите на образуването на AGEs подобряват бъбречната функция и потискат свръхекспресията на TGF- β при диабетни животни [171].

Няколко проучвания доказват активна роля на CTGF при ДН. Нивата на CTGF в гломерулите и в плазмата са увеличени при диабетни животни. Съобщава се, че нивата на CTGF са повишени при пациенти с ДН. Освен това, Twigg et al. наскоро са открили, че инхибитор на AGEs, аминоксидин намалява бъбречния CTGF и нивата на фибронектин при експериментална ДН. Тъй като CTGF също играе роля в индуцираната от AGEs епително-мезенхимална трансдиференциация, потискане на експресията на CTGF може да бъде потенциална терапевтична цел за тубулогломерулосклерозата при ДН [171].

При гликиране на структурните белтъци от ГБМ намалява полианионният ѝ пълнеж, тя губи своите бариерни функции и се увеличава филтрацията на отрицателно зарядени циркулиращи белтъци. Гликираните протеини претърпяват конформационни промени (участват в кръстосано свързване). Колагенът свързва и акумулира албумин, имуноглобулини и други протеини, което води до задебеляване на ГБМ. Свързани там,

те запазват способността си да образуват имунни комплекси с други антигени и антитела, което активира комплементната каскада и довежда до допълнително увреждане на ГБМ [3].

Веднъж активиран, колагенът участва в кръстосано свързване, дори при нормогликемия. Това обяснява прогресията на ДН, дори при поддържане на оптимални кръвноразхарни нива. Гликираните протеини, отложени в ГБМ са слабо податливи на физиологична протеолиза. Ето защо задебеляването на ГБМ не търпи обратно развитие [3].

AGEs участват и в патогенезата на диабетна ретинопатия и диабетната полиневропатия.

Ретинопатията е сериозно микроваскуларно усложнение на диабета и е водеща причина за слепота при лица на възраст между 30 и 70 години. Характеризира се с повишена пролиферация на кръвоносните съдове, съдова оклузия, ангиогенеза, загуба на перипити от капсули на ретината, микроаневризми, кръвоизливи, увеличена проницаемост на ретината, задебеляване на капилярната базална мембрана и инфаркт, засягащ ретината на окото [134]. Потенциалното клинично приложение на RAGE блокадата включва намаляването на прогресията на диабетната ретинопатия, тъй като регулирането на RAGE води до провъзпалителни реакции от страна на глиалните Мюлерови клетки на ретината. AGEs играят важна роля в прогресията на диабетната ретинопатия и водят до дисфункция и смърт на различни клетки на ретината. Въздействието върху множество компоненти на оста AGE-RAGE, включително сигнална трансдукция и образуване на лиганди, могат да бъдат обещаващи цели за лечение на диабетна ретинопатия. Някои проучвания показват, че Мюлеровата глиална дисфункция в хода на диабетната ретинопатия при плъхове е свързана с натрупването на AGEs. Предклиничните и клиничните проучвания показват, че AGEs, включително метилглиоксалът въздействат върху патогенезата на диабетната ретинопатия. Установено е, че детоксикацията на метилглиоксалът намалява натрупването на AGEs, което от своя страна може да предотврати образуването на ключови невроглиални и съдови лезии на ретината. Взаимодействието AGE-RAGE играе централна роля в поддържането на възпаление, невродегенерацията и микроваскуларната дисфункция на ретината, възникващи по време на диабетната ретинопатия. Различни проучвания показват, че повишеното образуване на AGEs в стъкловидното тяло може да бъде включено в развитието на диабетна ретинопатия чрез индуциране на производството на FGF-b (фибробластен растежен фактор) от ретиналните клетки на Мюлер.

Проучванията са показали убедителни доказателства, че протеините на човешкото око са силно податливи на образуването на AGEs от реакцията на захари и карбонилни съединения. AGEs постепенно се натрупват в лещата и ретината, за да повлияят в по-голяма степен зрението. Последните открития показват, че N-(ε)-CML и AGEs са ключовите модулатори за развитието на непролиферативна ретинопатия при пациенти със ЗД тип 2. Някои доклади предполагат, че патофизиологичните каскади, предизвикани от AGEs, играят важна роля в развитието на микроваскуларните усложнения на диабета, включително ретинопатията [134].

Различни проучвания доказват наличието на AGEs в стените на ретинаталните кръвоносни съдове, което допринася за съдова оклузия и повишен пермеабилитет на ендотелните клетки на ретината, причинявайки съдово изтичане. Кръстосаното свързване на протеини с AGEs в стената на съда увеличава съдовата скованост и модифицирането на екстрацелуларните матриксни протеините, като намалява прикрепването им към перицита. AGEs-модифицираните екстрацелуларни протеини също причиняват увреждане на ретината чрез свързване към RAGE. Свързването с RAGE активира различни сигнални пътища, водещи до повишен оксидативен стрес и синтез на локални растежни фактори, цитокини и адхезионни молекули. AGEs са токсични за притежаващите AGE-рецептори перицити. Увреждането на перицитите е характерно при диабетната ретинопатия. Проучванията показват, че AGEs повишават нивата на RAGE mRNA в перицитите и микроваскуларните ендотелни клетки. Това повишаване на RAGE може да доведе до увеличаване на трансдукционните сигнали, с последващо стимулиране от AGEs и това може да изостри загубата на перицити при диабетна ретинопатия. Апоптозата на перицитите обикновено предшества съдовите промени и е характерна за ранната ретинопатия [134].

AGEs също така регулират експресията на ICAM-1 в култивираните говежди ретинални ендотелни клетки и допринасят за диабетна ретинална микроваскуларна левкостаза. Експозицията на клетките на ретината към AGEs причинява повишено отделяне на VEGF чрез увеличаване на VEGF генната експресия. VEGF стимулира ангиогенезата и неоваскуларизацията, които участват в патогенезата на пролиферативната ретинопатия. Нивата на VEGF в очната течност корелират със степента на неоваскуларизация при ретинопатията и също са свързани с увреждане на кръвно-ретиналната бариера с последваща повишената микросъдова проницаемост, наблюдавана при ретинопатията. Намалената перфузия на ретината, която е резултат от капилярна загуба, води до исхемия, която се смята за причина за увреждането на

кръвно-ретиалната бариера и неоваскуларизацията на ретината. Едно проучване показва увеличение на нивата на AGEs и IL-6 в окото на стъкловидното тяло при пациенти с диабетна ретинопатия. AGEs стимулира секрецията на IL-6 от човешките ретиални клетки, което индуцира ангиогенезата чрез повишена експресия на VEGF. Повишената адхезия на левкоцитите към ретиалните ендотелиални клетки при експериментален диабет може да доведе до апоптоза на ендотелиална клетка чрез Fas — Fas лигандния път. Повишената съдова пропускливост е свързана с локално повишаване на концентрацията на VEGF. В ретината VEGF се продуцира от пигментни епителни клетки на ретината, перицити, астроцити, Мюлерови глиални и ендотелни клетки. Местната хипоксия, повишените нива на възпалителни цитокини, AGEs и реактивни кислородни видове, които се наблюдават при диабет, могат да индуцират VEGF-генна експресия [134].

AGEs играят основна роля в загубата на прозрачност на лещите, т.е. развитие на катаракта. Катарактата е основна причина за слепотата в развитите и развиващите се страни. Честотата на катаракта се увеличава при пациенти със ЗД. Счита се, че гликирането на протеините на очните лещи е един от механизмите, отговорни за диабетната катаракта, която е водещата причина за слепотата. Последните резултати показват, че AGEs играят съществена роля в дегенеративните промени в лещите и подходите за използване на храни с ниско съдържание на AGEs могат да бъдат полезни за забавяне на образуването на катаракта. Някои съобщения показват, че AGEs се натрупват в лещата и причиняват зрително увреждане, катаракта. AGEs предизвикват необратими промени в структурните протеини, които водят до агрегиране на белтъците на лещите и образуване на агрегати с високо молекулно тегло, които разсейват светлината и пречат на зрението. Скоростта на натрупване на AGEs е свързана с тежестта на диабетната катаракта. Повишените нива на глюкоза в стъкловидното тяло могат да предизвикат гликиране на протеини на лещите с последващо генериране на супероксидни радикали и образуването на AGEs. Взаимодействието на AGE с RAGE в епитела на лещата допълнително увеличава образуването на O_2^- и H_2O_2 . В допълнение към повишените нива на свободни радикали, лещите на диабетици показват нарушена антиоксидантна способност, повишавайки податливостта им към оксидативен стрес [134].

Диабетната полиневропатия е сериозно усложнение, засягащо както автономните, така и периферните нерви. Пациентите с диабет и полиневропатия имат променливи симптоми и физикални находки, вариращи от асимптоматична загуба на

сухожилен рефлекс до тежка болезнена невропатия. Диабетната полиневропатия също причинява уринарна инконтиненция, диария и запек, което нарушава качеството на живот на диабетиците. Habib и Brannagan съобщават, че строгият гликемичен контрол е един от терапевтичните подходи за контролиране на диабетния полиневропатия [134]. Проучванията показват, че AGE-RAGE осите участват в патогенезата на диабетното стъпало, наблюдавано при диабетна полиневропатия. Известно е, че формирането на AGEs от реактивни дикарбонили играе важна роля в патогенезата на сетивните увреждане на невроните. Доказано е, че гликоладехидът (прекурсор на AGEs) при физиологична концентрация намалява жизнеспособността на швановите клетки в плъхове, което допринася за патогенезата и развитието на диабетна полиневропатия. Повишените тъканни и клетъчни нива на глюкоза също стимулират гликолитичните и полиолните пътища в периферните нерви. Локализацията на AGEs е изследвана в периферен нерв на пациенти и експериментални животни с диабет. В периферните нерви на диабетици, N-(ε)-CML присъства в съдови ендотелни клетки, перичитите и базалните мембрани, както и в аксоните и швановите клетки. Проучванията показват повишена експресия на RAGE в периферните нерви при плъх чрез *in situ* хибридизация. В периферните нерви на плъх, RAGE се експресира в ендотелни и швановите клетки на перинеуралните и ендоневралните съдове. Модификацията на протеини с AGEs причинява структурни и функционални промени в периферния нерв. Показано е, че *in vitro* инкубирането на невронни клетки и шванови клетки с AGEs предизвиква клетъчна смърт. Загубата на влакна в периферните нерви на диабетици може отчасти да се обясни с акумулирането на AGEs. Модификацията на неврофиламента и тубулина с AGEs може да повлияе на транспорта през аксоните. Прекъсването на аксоновия транспорт допринася за развитието на атрофия и дегенерация на нервните влакна. Модификацията на протеин P0 с AGEs може да служи като основа за демиелинизация на нервните влакна [134].

При пациенти с диабет и животински модели, гликирането на Na⁺ K⁺ -АТРаза може да причини редукция на скоростта на проводимост на моторния нерв. Гликирането на колагена и ламинина променя електрическия заряд на базалната мембрана, което увеличава пропускливостта на кръвоносните съдове и може да причини задебеляване на базалната мембрана. Съобщава се, че азотният оксид (NO), медиатор за вазодилатация, се инхибира от AGEs. В допълнение, AGEs влияят на нивото на експресия на NO синтаза, като по този начин намаляват кръвния поток на нервите и индуцира хипоксия в периферния нерв. Тъй като RAGE се експресира в

ендотелните клетки на пери- и ендоневралните кръвоносни съдове, се приема, че взаимодействието между AGE и RAGE върху ендотелиалните клетки играе роля в развитието на периферна полиневропатия. Показано е, че свързването на AGEs с RAGE в ендотелната клетка активира транскрипционни фактори NF- κ B и активаторен протеин-1 (AP-1) и увеличаване, експресията на молекулите на съдова клетъчна адхезия-1 и цитокини като TNF и интерлевкин-6. В заключение образуването и натрупването на AGEs в периферния нерв включва развитието на диабетна полиневропатия, директно чрез въздействие върху структурни и функционални протеини и индиректно чрез активиране на рецепторите за AGEs. Тези патологични процеси могат да засегнат всеки клетъчен компонент в периферната нервна тъкан. Взаимодействията между AGE и RAGE улесняват ендо-невралната васкуларна дисфункция което води до микроангиопатия в периферния нерв [134].

Намерени са два пътя на терапевтично въздействие върху гликирането: чрез инхибиране процеса на формиране на AGEs (Aminoguanidin) и чрез инхибиране на ефекта на гликиране, т.е разграждане на кръстосаните връзки между гликираните белтъци (phenacetylthiazolum bromide). Установено е не само намаление на акумулираните гликирани продукти, но и намаление на редица маркери на бъбречното увреждане – албуминурия и мезангиална експанзия [3].

Като беше споменато, AGEs представляват различни протеинови продукти, чието натрупване променя структурата и функцията на тъканните протеини и стимулира клетъчните реакции. Те са замесени в тъканните увреждания, свързани с развитието на диабетните усложнения. За да се оцени възможната връзка между натрупването на AGEs и развитието на ДН, Horrie et al. изследват имунохистохимичната локализация на различни AGEs (пентозидин, N-(ϵ)-CML и пиралин) в диабетни и контролни бъбреци. N-(ϵ)-CML и пентозидинът се натрупват в разширения мезангиален матрикс и в задебелените гломеруларни капилярни стени в ранният етап на ДН, както и в нодуларните лезии и артериалните стени при напреднала ДН, но липсват при контролните бъбреци. Обратно, пиралинът не е намерен в диабетните гломерули, но е открит в интерстициалната съединителна тъкан, както на нормалните, така и на диабетните бъбреци. Това проучване показва, че въпреки, че разпределението на пиралин е топографски идентично с колаген тип III, разпределението на пентозидин и N-(ϵ)-CML не зависи от типа на колагена, което предполага, че разликата в състава на матриксния протеин сама по себе си не може да обясни хетерогенната локализация на AGEs. Тъй като окислението е тясно свързано с образуването на пентозидин и N-(ϵ)-

CML, в това проучване е изследвано отлагането на малондиалдехид (МДА), продукт на липидна пероксидация, чието образуване се ускорява от оксидативния стрес. Локалният оксидативен стрес служи като механизъм за натрупване на пентозидин и N-(ε)-CML. В съответствие с това предположение, диабетните възли се оцветяват положително за МДА. Тези находки показват, че локализацията на AGEs при ДН варира в зависимост от структурата на AGEs, и предполагат, че едновременната локализацията на маркерите на гликирането (пентозидин и N-(ε)-CML) с маркерът за липидна пероксидация отразява локален оксидативен стрес, който е свързан с патогенезата на диабетните гломерулни лезии. По този начин маркерите на гликирането могат да служат като полезни биомаркери за окислително увреждане при ДН [62].

В много проучвания е докладвано, че хипергликемията е свързана с васкуларна дисфункция при пациенти със захарен диабет, директно или чрез формиране на AGEs. В проведено проучване в Университетска болница в Париж, Франция от Wautier MP et al., включващо 51 мъже и 26 жени със ЗД и контролна група пациенти без диабет, състояща се от 39 мъже и 21 жени е доказано, че серумните нива на AGEs са значително повишени при пациенти с диабет тип II в сравнение с контролите ($P < 0,001$). Кръвните нива на N-(ε)-CML-HSP са значително повишени при пациенти с диабет в сравнение с нормалните пациенти [$P < 0,0001$]. При пациенти с диабет с ретинопатия и/или микроалбминурия (екскреция на албумин в урината: OAE > 30 mg / 24 h), нивата на N-(ε)-CML-HSP са значително по-високи ($P < 0,02$) и дори по-високи при пациенти с двете усложнения [164].

В проучването на Hirata K и Kubo K, включващо 97 пациента със ЗД тип 2 е изследвана връзката между серумните нива на N-(ε)-CML и пентозидин и тежестта на микроангиопатията. Според него нивата на N-(ε)-CML и пентозидина са значително по-високи при пациенти с хронична бъбречна недостатъчност, отколкото при тези с нормоалбминурия, микроалбминурия или макроалбминурия (всички $p < 0,05$). Сред диабетниците без нефропатия ($n = 49$) нивата на N-(ε)-CML в кръвта са значително по-високи при пациентите, които са имали пролиферативна диабетна ретинопатия, отколкото при тези без ретинопатия и при тези с непролиферативна ретинопатия. За разлика от това, нивата на пентозидин в кръвта не са показвали значителни разлики при пациентите с трите типа пациенти. Това проучване показва, че нивото на N-(ε)-CML в кръвта е свързано с тежестта както на нефропатия, така и на ретинопатия, докато нивото на пентозидин е свързано само с тежестта на нефропатията [60].

В едно проучвания на Wagner Z et al., проведено в Печ, Унгария включващо 109 болни със ЗД с нормална и увредена бъбречна функция са изследвани нивата на N-(ε)-CML в серума и урината (като се използва новоразработен ензимно-свързан имуносорбентен анализ), както и серумната AGE-флуоресценция. Установени са повишени нива на серумните флуоресцентни AGEs и N-(ε)-CML, както и намалени скорости на отделяне на N-(ε)-CML с урината при пациенти с диабет с бъбречно увреждане, но не и при тези с нормална бъбречна функция. При наличието на нарушена бъбречна функция, серумните нива на N-(ε)-CML и флуоресцентни AGEs показват значителна обратна връзка с креатининовия клирънс и значителна пряка връзка помежду си. Не е открита връзка между нивата на серумния AGEs и параметрите на контрола на кръвната захар или наличието на следните клинични усложнения: исхемична болест на сърцето, диабетна ретинопатия и невропатия [162].

Тези резултати не се потвърждават от проучването на Melinda T. Coughlan, проведено в Мелбурн, Австралия. В него са проследени бъбречните, плазмените и уринните концентрации на N-(ε)-CML при плъхове и хора с диабет. Анализът на резултатите показва, че при плъхове с индуциран захарен диабет се установяват по-високи плазмени нива на N-(ε)-CML, докато уринните нива нарастват при спад на бъбречната функция. Освен това при диабетици уринната екскреция на N-(ε)-CML нараства с нарастваща тежест на нефропатия [29].

В проучване проведено от Klein R et. al. в Университетска болница в Хелзинки включващо проследяване на 1210 пациента със ЗД тип 1 за период от 22 години е установено, че серумните нива на sRAGE са значително свързани с честотата на ДН. Няма значими връзки между серумните N-(ε)-CML и честотата на ДН [77].

Genuth et al. в Университетската болница в Кливланд изказват хипотезата, че гликирането на кожен колаген и AGEs предсказват риска от прогресиране на микроваскуларното заболяване. Те провеждат 10-годишно проследяване на нивата на AGEs в кожен колагаен при диабетици. При многовариантни анализи е установено, че комбинацията от фурозин (гликиран колаген) и N-(ε)-CML предсказва прогресията на ретинопатията ($\chi^2 = 59,4$, $P < 0,0001$) и нефропатия ($\chi^2 = 18,2$, $P = 0,0001$) [45].

Освен N-(ε)-CML, имидазолон е друг AGEs, който се образува при реакцията на Maillard. В едно проучване, проведено от Niwa и сътр. в град Накая, Япония е установено, че нивата на имидазолон в еритроцитите на пациенти с диабет са значително повишени в сравнение с тези на здрави индивиди. Изследвана е локализацията на имидазолон в бъбреците и аортата при пациенти с диабет чрез

имунохистохимия, използвайки антитяло. Специфичната имидазолонова имунореактивност се открива в нодуларни лезии и разширения мезангиален матрикс на гломерулите и бъбречни артерии в напреднал стадий на ДН, както и при атеросклеротичните лезии на аортата. Тези резултати, взети заедно с неотдавнашна демонстрация на повишени серумни нива на 3-DG при диабет, силно предполагат, че имидазолон, произвеждан от 3-DG, може да допринесе за прогресирането на дългосрочни диабетни усложнения като нефропатия и атеросклероза [113, 114].

Освен това в едно проучване проведено в медицински университет Кумамото, Япония е докладвано, че наличните *in vivo* структури на N-(ε)-CML могат да служат като имуногени за генериране на автоантитела. Пациентите с бъбречна недостатъчност, причинена от диабет или недиабетна патология имат по-висока активност на автоантитела срещу N-(ε)-CML, отколкото тези при здрави индивиди и при пациенти със ЗД без бъбречна недостатъчност. Тези резултати показват, че натрупаната *in vivo* N-(ε)-CML служи като имунологичен епитоп за генериране на автоантитела, специфично за N-(ε)-CML, което може да се използва като потенциален маркер за диабетна нефропатия или хронична бъбречна недостатъчност [113].

Проведените проучвания показват съществената ролята на AGEs в патогенезата на диабетните усложнения .

5.3. Роля на оксидативния стрес

Ключова роля в патогенезата на ДН взема и индуцираната от хипергликемия повишена продукция на митохондриални реактивни кислородни видове (ROS), която се счита за важен медиатор на съдовите усложнения при ЗД. Хипергликемията генерира ROS в резултат на глюкозна авто-оксидация, метаболизъм и образуване на AGEs. Установено е, че ROS-медираната бъбречна клетъчна апоптоза се индуцира от хипергликемия, ангиотензин II, TGF-β и албумин. Доказано е, че митохондриите са основния източник на вътреклетъчни ROS. Митохондриалните ROS предизвикват окислително увреждане на протеини, липиди и ДНК, което в крайна сметка води до апоптоза и бъбречно увреждане. Известно е, че много бъбречни клетъчни типове като мезангиални клетки, ендотелиални клетки и тубулни епителни клетки продуцират високи нива на ROS при хипергликемични състояния. Впоследствие ROS активират няколко провъзпалителни транскрипционни фактори, водещи до производството на цитокини, хемокини и съдови адхезионни молекули, които впоследствие увеличават

притока на възпалителни клетки в бъбреците. Това инициирано ROS-медирано бъбречно възпаление допълнително утежнява ROS-медирано клетъчно увреждане, апоптозата и бъбречната дисфункция. Установено е, че участниците в образуването на ROS в диабетичния бъбрек са супероксиди, произвеждащи ензимите NADPH оксидаза (NOX) и ксантин оксидаза, която катализира оксидацията на хипоксантина. В допълнение, внезапната продукция на ROS и намален антиоксидантен капацитет предизвиква апоптоза, която води до увреждане на бъбреците при ДН [133].

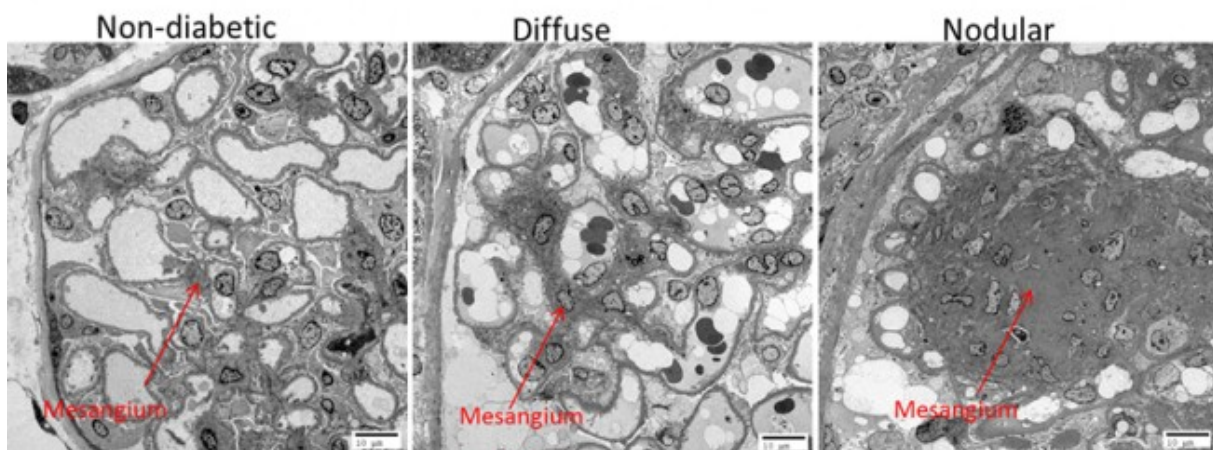
Гликирането и полиолният път са два независими пътя на организма за справяне с персистиращата хипергликемия. Получената обаче в крайния етап фруктоза от ензимното гликиране може да се включи в неензимното гликиране с образуване на AGEs. Последващата акумулация на гликираните продукти довежда до експанзия на ЕЦМ в мезангиума, задебеляване на ГБМ, на тубулните базални мембрани, хиализиране на аферентната и еферентната артериола, редуциране на числената плътност на подоцитите, продукция на вазоактивни амини [3].

6. Патоанатомия:

6.1. Морфологични изменения при ДН:

Морфологичните промени на бъбрека при ДН са специфични за това заболяване и са важни за прогнозата на пациента. Морфологичните лезии при ЗД тип 1 засягат главно гломерулите със задебеляване на гломерулна базална мембрана (ГБМ) и мезангиална експанзия, въпреки че и подоцитите, бъбречните тубули, интерстициума и артериолите претърпяват значителни промени, особено в по-късните стадии на заболяването. Задебеляването на ГБМ е първата измерима промяна, която се открива през 1,5 до 2,5 години след началото на ЗД тип 1. Задебеляването на тубулната базална мембрана (ТБМ) е паралелно със задебеляването на ГБМ, което означава, че гломеруларните хемодинамични смущения не са необходими за тези промени. Мезангиалното разширение, предимно поради увеличаване на мезангиалния матрикс, се развива по-късно, въпреки че увеличаването на матриксният компонент на мезангиума може да бъде открито още на 5-7 година след началото на диабета. След това, тези структурни промени не се развиват непременно със същата скорост при отделните пациенти [41, 149]. В действителност, докато задебеляването на ГБМ може да се развива постоянно с течение на времето, мезангиалната експанзия има по-асимптоматична връзка с продължителността на ЗД тип 1 (Steinke J, Mauer M,

непубликувани наблюдения). Въпреки това, когато се появи бъбречна недостатъчност, се забелязва изразена мезангиална експанзия и увеличена дебелина на ГБМ в почти всички пациенти с ЗД тип 1. Лезиите при ДН могат да бъдат идентифицирани или като дифузни, или като нодуларни. Дифузната гломерулна лезия се явява като разширение на мезангиалната тъкан, която притиска гломерилните капилляри и по този начин се намалява площта за филтриране. Дифузната мезангиална експанзия, често е свързана с поява на нодуларни лезии, състоящи се от области с изразена мезангиална експанзия, образуващи големи кръгли фибрилерни мезангиални зони с палисадно разположение на мезангиалните ядра около периферията на нодула и компресия на свързаните гломерулни капилляри – възли (нодули) на Kimmelstiel-Willson [41]. Тези възли представляват кръгли хомогенни еозинофилни участъци в мезангиума като техният брой и размерите в гломерулите може да бъде различен. Те са специфични за ДН, но са налице само в 20 - 67% от пациентите с дифузна лезия [149]. Както мезангиалното разширение, така и задебеляването на ГБМ и ТБМ са следствие от натрупването на екстрацелуларен матрикс (ЕЦМ), с повишено отлагане на нормалните ЕЦМ компоненти от тип IV и VI колаген, ламинин и фибронектин, поради тяхното повишено производство, намалено деградация или и двете. За разлика от мезангиума, първоначалната интерстициална експанзия се дължи главно на увеличаване на клетъчния компонент на този бъбречен компартимент; увеличаването на фибрилерния колаген, който всъщност сравнително късно се открива при това заболяване и то при пациенти с вече установен спад в скоростта на гломерулната филтрация (eGFR) [41] (фиг. 1).



Фиг.1. Типове диабетна гломерулосклероза /Histological appearance of Diabetic Nephropathy -Diabetes/.

Аферентна и еферентна артериоларна хиалиноза може да присъства в рамките на няколко години след началото на диабета. Тази ексудативна лезия, съставена от плазмените протеини, особено имуноглобулините, съставките на комплемента, фибриногена и албумина, в крайна сметка може да замени гладките мускулни клетки, като тежестта на артериоларната хиалиноза значително корелирана с процента склерозирани гломерули. Това предполага, че тази съдова лезия може да допринесе за глобална гломерулна склероза. Подобни лезии могат да се появят с все още неизследвана клинична значимост в гломерулното субендотелиално пространство (хиалинови капачки) и по париеталната повърхност на капсулата на Бауман (капсулни капки) [41].

Въпреки, че съществуват патоморфологични класификации за няколко бъбречни заболявания, като IgA нефропатия, фокална сегментна гломерулосклероза и лупусна нефропатия, липсва еднаква класификация за ДН. Класификационните схеми водят до по-добра комуникация между бъбречни патолози и клиницисти, осигуряват логистична структура за прогностични и интервенционни проучвания и подобряват клиничното управление и ефективността на заболяванията [38].

През 1959 г. Gellman et al. публикуват първият доклад на резултатите от бъбречните биопсии при пациенти с ДН. Преди тяхното проучване бъбречната патология при пациенти със ЗД е описана само при аутопсия. Gellman предлага сложна систематична оценка, изследваща гломерулите, тубулите, артериолите и интерстициума, които не са подходящи за практическа употреба. Напоследък са направени опити за категоризиране на моделите, наблюдавани при ДН при ЗД тип 2. Gambara et al. и Fioretto et al. са описали основни различия между типични и нетипични морфологични промени при ДН, както и за други гломерулни заболявания, насложени върху ДН. Въпреки че такива схеми са полезни за биопсии с научна цел, те не са практични за клинична употреба [150].

През 2010 г. група от международни експерти (Teravaert и сътр.) разработват консенсусна класификация на ДН, чиято цел е да представи степента на тежест на лезиите при пациенти със ЗД тип 1 и тип 2, които биха били лесни за използване в клиничната практика. Тя установява минимален стандарт за качество за оценяване на биопсиите. Минималният размер на пробата за адекватна оценка е 10 гломерула, а биопсията трябва да се оцветява с HE /хематоксилин и еозин/, PAS /перйодна киселина-Shiff/, Метенамин-сребро и Trichrom по Masson. Имунофлуоресценцията изисква използването на антитела срещу IgA, IgG, IgM, C3, C1q, капа и ламбда леки

вериги за изключване на други бъбречни заболявания. Пробата трябва да бъде подложена на електронномикроскопско изследване [38, 150].

Тежестта на лезиите се класифицират според участието на гломерулите в четири класа:

- Клас I: Задебеляване на ГБМ

Той се характеризира с нормална находка или минимални промени на светлинна микроскопия, които не отговарят на критериите за клас II до IV (отсъствие на мезангиална експанзия, нодули на Kimmelstiel – Wilson и глобална гломерулосклероза на повече от 50% от гломерули) и задебеляване на ГБМ на електронна микроскопия (при мъже средно по-дебела от 430 nm, а при жени средно по-дебели от 395 nm.) [38].

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

Той се характеризира с лека или тежка мезангиална експанзия, като тези промени не отговарят на критериите за включване към клас III или IV. Морфологичните изменения в този клас съответстват на термина "дифузна диабетна гломерулосклероза". 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 капиларния 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 IIa. Разширяването на клетъчни и матриксните компоненти в мезангиума е отличителен белег на ЗД тип 1 и тип 2. Може да се открие при някои пациенти в рамките на няколко години след началото на ЗД тип 1. Когато мезангиума се разширява, той ограничава гломерулните капилляри и намалява капилярната филтрационна повърхност [38, 150].

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

Този клас се характеризира с наличието на поне една нодуларна лезия (лезия на Kimmelsteil-Wilson), при условие че не съществува повече от 50% от склерозирани гломерули [38].

Paul Kimmelsteil и Clifford Wilson, германец и англичанин, описват за първи път възли в гломерулите при осем пациенти с диабет в зряла възраст през 1936 г. Те не асоциират тези лезии с диабета. Това прави Arthur Allen през 1941 г. в свое проучване, включващо 105 пациенти с диабет. Нодуларните склеротични лезии могат да се появят и при липса на ДН, които са клинично свързани с хипертония, тютюнопушене, хиперхолестеролемия и екстраренална съдова болест.

Твърди се, че в началния етап на развитие на нодуларните склеротични лезии при ДН се осъществяват два важни процеса: литични промени в мезангиалната област, наречени мезангиолиза и отделяне на ендотелни клетки от ГБМ. Paueksakon et al. са открили фрагментирани червени кръвни клетки в лезии на Kimmelstiel – Wilson, което подкрепя теорията, че микроваскуларното увреждане допринася за патогенезата на тези лезии. Дисоциацията на ендотелните клетки може да разруши връзките между мезангиалната област и ГБМ. Този процес предхожда разширяването на лезиите на Kimmelstiel – Wilson. Тези лезии се състоят от натрупване на мезангиален матрикс с колагенови фибрили, малки липидни частици и клетъчни остатъци. Напълно развита лезия на Kimmelstiel – Wilson унищожават нормалната структура на гломерулния сноп с намаляване на мезангиалните клетки, особено в централната област.

Наличието на поне една лезия на Kimmelstiel – Wilson се асоциира с по-голяма продължителност на ЗД и по-неблагоприятни клинични параметри. В проучване на 36 пациенти със ЗД тип 2, пациентите с лезии на Kimmelstiel – Wilson имат по-тежка обща ретинопатия и по-високи концентрации на серумния креатинин в сравнение с тези с мезангиални лезии. В проучване на 124 китайски пациенти с диабет тип 2 пациентите с поне една лезия на Kimmelstiel – Wilson имат относително голяма продължителност на захарния диабет, лоша прогноза и чести доказателства за диабетна ретинопатия [38, 150].

- Клас IV или напреднала диабетна гломерулосклероза

При този клас е налице повече от 50% склерозирани гломерули в патоморфологичния материал, като тази лезия се дължи на ДН, т.е. наличието на лезии от клас II или III или дълга история на ЗД и диабетна ретинопатия. Гломерулосклерозата при ДН е крайната точка на многофакторни механизми, които водят до прекомерно натрупване на извънклетъчни матриксни протеини като колаген тип I, III и IV и фибронектин в мезангиалното пространство, което през етапите на мезангиалното разширение и развитие на Kimmelstiel – Wilson лезиите води до гломерулосклероза [38,150].

Освен това, степента на интерстициална фиброза, интерстициално възпаление, артериоларна хиалиноза и артериосклероза също се оценяват. Тези резултати обаче не се вземат предвид при окончателното класифициране на диабетната нефропатия. Съществуващите съпътстващи заболявания също трябва да бъдат докладвани. Интерстициалната фиброза и тубуларната атрофия (ИФТА) се оценяват с полуколичествена скала (0–3+) като процент от общата засегната площ на интерстициума и тубулите, както следва: 0 за отсъствие на интерстициална фиброза, 1

за <25%, 2 за 25% –50% и 3 за > 50% засягане. В тази класификационна система прагът между 0 и 1 е различен от критериите на Vanff, който счита, че засягане <10% от интерстициалната фиброза е нормална находка. Този строг критерий за определяне на състоянието тубуло-интерстициум задължително означава, че голяма част от пациентите имат патологична тубуло-интерстициална структура [38]. Наличието на мононуклеарни клетки в интерстициума е широко призната находка в ДН. Възпалителните интерстициални инфилтрати съдържат Т лимфоцити и макрофаги. Интерстициалното възпаление се степенува с полуколичествена скала (0–2 +), 0 за липса на възпаление, 1 за възпаление в области на ИФТА и 2 за възпаление в области с нормална тубуло-интерстициална структура [38].

Според Stout et al., хиалинозата на еферентната артериола е относително специфична за ДН, но хиалинозата на аферентната артериола се среща и при много други състояния. Хроничната циклоспоринова нефропатия е типичен пример, при който артериоларната хиалиноза се появява извън ДН. Tracy et al. също така съобщават за наличието на артериоларна хиалиноза в бъбреците на млади пациенти с коронарна болест на сърцето. Артериалната хиалиноза също се класифицира с полуколичествена скала (0–2 +) като 0 е за липсваща, 1 за най-малко една област на хиалинови промени и 2 за повече от една област на артериоларна хиалиноза. И накрая, трябва да се докладва дали биопсията съдържа големи артерии (да / не) и артериосклерозата се класифицира в най-засегнатата артерия като 0 - за липса на удебеляване на интимата, 1- когато удебеляването на интимата е по-малко от дебелината на медиата и 2 - удебеляване на интимата е по-голяма от медиата. Така представената морфологична класификация на ДН е от съществено значение, защото дава възможност за допълнително разбиране на значението на диабетните лезии [38].

6.2. Идиопатична нодуларна гломерулосклероза

През последните 20 години в литературата се появиха съобщения за болни с морфологични данни за диабетна нефропатия без захарен диабет [129]. Това дава основания на някои автори да я нарекат „идиопатична нодуларна гломерулосклероза“ (ИНГ) или „диабетна нефропатия без диабет“. В литературата се среща и с името „нодуларна гломерулосклероза при пушачи“ или „нормогликемична диабетна нефропатия“. Тя има постоянен и прогресивен ход, като дори и при напреднал стадий трудно се разграничава от ДН [100].

Нодуларна гломерулосклероза може да се установи и при други патологични процеси като амилоидоза, заболявания, свързани с отлагане на леки вериги, фибрилерна или имунотактоидна нефропатия, болести, свързани с 3-ти тип колаген, нодуларен мембранопрлиферативен гломерулонефрит, артериит на Takayasu's [43, 44, 65, 102, 129, 151].

Идиопатичната нодуларна гломерулосклероза е диагноза на изключването, налагаща системно изследване на болния, с изключване на горните диагнози, включително и захарен диабет [1].

6.2.1 Честота

ИНГ е относително рядка хистопатологична находка. В достъпната чуждестранна литература са описани само около 100 случая на пациенти с такива изменения.

Честотата е ниска, а в различни проучвания, обхващащи малко по-голям брой болни, а не единични случаи, отчитат разлика и в половото засягане. При анализ на 3480 бъбречни биопсии са установени 20 болни с ИНГ (1 от 174 биопсии), по-често мъже, при средна възраст около 55 години с наднормено тегло, над 85% са с хипертония и с анамнеза за тютюнопушене, а 50% са с дислипидемия [169].

При анализ на данните на 15 болни Li и сътр. отчитат, че пациентите с ИНГ по-често са жени (67%), със средната възраст около 64 г., по-голямата част от тях са пушачи (67%) и имат анамнеза за хипертония (93%), с наднормено тегло (60%). При 93% от пациентите заболяването се характеризира с влошена бъбречна функция, с масивна протеинурия и с нефрозен синдром [91].

Markowitz и сътр. след преглед на 5073 бъбречни биопсии установяват ИНГ при 23 болни (0,45%), след като изключват наличие на захарен диабет. Възрастта е около 68 години, предимно бели, по-често мъже (73%). Типична честа находка е влошената бъбречна функция с повишен серумен креатинин, протеинурия над 3 g/24 h и разгънат нефрозен синдром. Почти всички пациенти са с хипертония, 91% са пушачи, 90% са с хиперхолестеролемия и 44% са с екстраренални съдови заболявания [104].

6.2.2. Патогенеза

Докато клиничната, лабораторна и морфологична характеристика е доста сходна при повече от докладваните болни, то все още патогенезата е дискутабилна и не

напълно изяснена.

Повече от авторите са единодушни, че заболяването е особено често при пушачи и при болни с хипертония, които са класическите рискови фактори за хронично бъбречно заболяване, като дори се предлага ИНГ да се нарече „ИНГ при пушачи“. Асоциираната ИНГ с тези два фактора може да се отдели като отделна нова форма от идиопатичната нодуларна гломерулосклероза [27, 53, 93, 75, 102, 134]. Предлага се тази хистологична находка, установена при пушачи да не се нарича „идиопатична“, като се обсъжда възможната роля на напредналите продукти на гликирането, на оксидативния стрес, симпатикусова активация, хипоксия, отделяне на растежни фактори, ангиогенеза и въздействие на хемодинамични фактори [134]. Предполага се, че пушенето предизвиква допълнително хронична тромботична микроангиопатия, която вероятно също участва в патогенезата на ИНГ [93, 134].

Дислипидемията, метаболитния синдром, наднорменото тегло и затлъстяването се приемат също като едни от честите причини за ИНГ [91, 148]. В животински модели е отчетено засилване на бъбречните промени във връзка с глюколипотоксичност върху подоцитите и гломерулната филтрационна мембрана от метаболитния синдром, инсулиновата резистентност, слабото възпаление, ендотелната дисфункция и съдовите промени, които могат да се свържат с появата и прогресията на ИНГ. Някои автори предполагат, че това е специална форма на атеросклероза или на метаболитна гломерулопатия [150].

Продължителната хипертония е отчетена като съпътстващ фактор при анализ на данните от единични или малки групи болни, описани от различни колективи [73, 84, 104]. Според някои проучвания, ИНГ е фенотип на артериосклеротично бъбречно увреждане, като тежката по степен артерио-артериолосклероза е свързана с образуването и прогресията на нодозните изменение [84].

Докладвани, обаче, са и случаи с ИНГ без да са изявени типичните причини за нея. През 2012 г. се описва случай на ИНГ при жена, при която липсват обичайните предразполагащи фактори за заболяването - артериална хипертония, обезитет, хиперхолестеролемия и тютюнопушене [159]. Авторите предполагат, че освен до сега известните предразполагащи фактори за развитие на ИНГ, вероятно има и други, неотчетени до момента. Впоследствие и друг колектив описва такава патология при нормотензивна непушачка, но със затлъстяване, без захарен диабет. Авторите свързват промените в бъбречната морфология с метаболитния синдром и инсулинова резистентност, което може да обясни в известна степен промените, наподобяващи

диабетна нефропатия, но при нормогликемия [40]. Някои автори предполагат, че в появата на ИНГ при пациенти с нормален или незначително нарушен глюкозен толеранс участват и друг фактор или фактори, които до момента не са установени [66].

Интерес предизвиква съобщението на Filiponne и сътр. за посттрансплантационна нормогликемична диабетна нефропатия, при което на болен с лупус се трансплантира бъбрек от пациент със захарен диабет. Две години по-късно, поради масивна протеинурия с бъбречна биопсия на графта се установява диабетна нефропатия, която е липсвала при предтрансплантационната биопсия [40].

6.2.3. Морфологична находка

Обичайната морфологична находка на ИНГ, описвана от авторите е дифузна и нодуларна гломерулосклероза, установявана при всички пациенти, артерио-артериолосклероза при около 80%, задебеляване на гломерулната базална мембрана при около 85% [84, 91, 104] . Имунофлуоресцентната и електронната микроскопия не установяват съществени промени.

Markowich и сътр. доказват имунохистохимични отлагания за CD34, който е маркер за ендотелни клетки, както и повишен брой на васкуларните канали, в сравнение с контролната група пациенти [104].

6.2.4. Прогноза

При проследяване, за около 26 месеца след бъбречната биопсия почти 1/3 от болните достигат до терминална бъбречна недостатъчност, като рискови фактори за прогресията на заболяването са продължаване на пушенето след диагностициране на заболяването, липса на ангиотензин II блокада, степента на тубулна атрофия, на артериосклероза и интерстициална фиброза. Предполага се, че ИНГ е прогресивно „микроваскуларно усложнение“, свързано с тютюнопушене и хипертония [91, 104].

Wu и сътр. установяват, че по време на бъбречната биопсия болните с ИНГ са били със серумен креатинин около 330 $\mu\text{mol/L}$ и за около 20 дневен период след морфологичното уточняване 6 от 20 болни са достигнали до терминална бъбречна недостатъчност с необходимост от провеждане на диализно лечение, 5 са влошили значително бъбречната функция, но са останали в преддиализен стадий.

Може да обобщим, че ИНГ е относително нова морфологична находка, изцяло наподобяваща диабетна нефропатия, но установяваща се при пациенти без диабет. Много често се свързва с тютюнопушене, затлъстяване, дислипидемия и хипертония.

Морфологично не може да се отдиференцира от диабетната нефропатия. Диагнозата се поставя по метода на изключването на захарен диабет или на други нефропатии, които могат да се изявят с такава морфология. Характеризира се с масивна протеинурия, влошена бъбречна функция и относително лоша прогноза по отношение на бъбречната преживяемост.

7. Клинична и лабораторни признаци на ДН

При по-голямата част от пациентите със ЗД тип 1 клиничните прояви на ДН - загуба на протеин в урината (албуминурия), повишаване на кръвното налягане и намаляване на бъбречната функция (измерена чрез скоростта на гломерулната филтрация (eGFR) - корелират с характеристични структурни параметри при ДН. Въпреки това, много пациенти със ЗД тип 2 и прогресираща ХБН нямат албуминурия и хистологичната картина на бъбречно увреждане следва неklasически път [149].

ДН клинично се определя като наличие на протеинурия над 500 mg/24 h в присъствие на ретинопатия.

Първият клиничен признак за бъбречно засягане, дължащ се на диабет е хиперфилтрация, характеризираща се с повишена скорост на гломерулна филтрация над 120 mL/min/1,73 m², последвана от появата на микроалбуминурия (съотношение на албумин/креатинин > 30 mg/g) [1,2,38]. Микроалбуминурията е израз на ендотелно увреждане на съдовете [1,2,149].

Естествената история на бъбречното участие при диабет се характеризира по-добре при пациенти със ЗД тип I, тъй като началото на диабета е точно известно. Наблюдавано е, че микроалбуминурия при пациенти със ЗД тип 1 рядко се появява през първите пет години. Без специфична интервенция, 80% от пациенти със ЗД тип I, които развиват микроалбуминурия, ще развият протеинурия (екскреция на албумин > 300 mg/g креатинин) за период от 10-15 години. През този период от време ще се появи и хипертония. След като е налице протеинурия, скоростта на гломерулната филтрация намалява прогресивно с променлива скорост, варираща между 2-20 mL/min/година. Приблизително 50% от пациентите със ЗД тип 1 и протеинурия ще прогресират до крайния стадий на бъбречно заболяване за период от 10 години и 75% за период от 20 години [38].

Естествената история на ДН е по-слабо установена при ЗД тип 2, тъй като промените в глюкозния метаболизъм са бавни и диабетът обикновено се установява

много години след това. При част от пациентите със ЗД тип 2 е налице микроалбуминурия или дори протеинурия по време на диагнозата. Без специфична интервенция 20% до 40% от пациентите със ЗД тип 2 с персистираща микроалбуминурия ще развият протеинурия. Въпреки това, 20 години след началото на протеинурията, само 20% от пациентите ще прогресират до крайния стадий на бъбречно заболяване [38].

Стадий на диабетната нефропатия според класификацията на Mogesen - 1999г.

- Стадий на хиперфилтрация – увеличаване с 20-50% на гломерулната филтрация, нормоалбуминурия, хистологично увеличен гломерулен размер.
- Стадий на нормоалбуминурия – увеличена с 20-40% гломерулна филтрация, хистологично задебелена базална мембрана.
- Стадий на начална диабетна нефропатия (албуминурия) – албумин в 24-часова урина 30-300 mg, намалена гломерулна филтрация $<60 \text{ mL/min/1.73m}^2$, хистологично задебелена базална мембрана, мезангиална пролиферация.
- Стадий на изразена диабетна нефропатия - албумин $>300 \text{ mg}$ в 24 часова урина, намалена гломерулна филтрация, изразени хистологични промени.
- Стадий на бъбречна недостатъчност – гломерулна филтрация $<15 \text{ mL/min/1.73m}^2$, албуминурия $>300 \text{ mg}$ в 24 часова урина, напреднали хистологични промени [149].

Бъбречните и сърдечносъдовите събития, както и смъртността, дължащи се на различни причини са значително повишени при пациентите с микроалбуминурия или протеинурия в сравнение с тези, наблюдавани при лица с нормоалбуминурия. При пациенти с бъбречно увреждане (дефинирано като $\text{eGFR} <60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$): рискът от прогресия се увеличава с появата на микроалбуминурия и допълнително се увеличава с появата на протеинурия; рискът от сърдечно-съдово увреждане е увеличен при тези с микроалбуминурия/протеинурия; а смъртността, свързана с различни причини е повишена при пациентите с протеинурия, както и при тези с нормоалбуминурия и микроалбуминурия, при които $\text{eGFR} <30 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. С оглед на това съвместната комисия по диабетна нефропатия преразгледа своята класификация (Класификация на диабетната нефропатия от 2014 г.) в съответствие с широкото използване на ключови понятия, като например оценката на скоростта на гломерулната филтрация (eGFR) и хроничното бъбречно заболяване (ХБЗ) [149].

Класификация на диабетната нефропатия – 2014 г.

Stage	Urinary albumin (mg/g Cr) or urinary protein (g/g Cr)	GFR (eGFR) (mL/min/1.73 m ²)
Stage 1 (pre-nephropathy)	Normoalbuminuria (<30)	≥30 [‡]
Stage 2 (incipient nephropathy)	Microalbuminuria (30–299) [§]	≥30
Stage 3 (overt nephropathy)	Macroalbuminuria (≥300) Or persistent proteinuria (≥0.5)	≥30 [†]
Stage 4 (kidney failure)	Any albuminuria/proteinuria status ^{**}	<30
Stage 5 (dialysis therapy)	Any status on continued dialysis therapy	

8. Маркери за проследяване на гликемичния контрол при пациенти със ХБЗ

Гликираният хемоглобин (HbA1c) от години е златен стандарт не само за измерване на гликемичния контрол, но и служи за предиктор на диабетните усложнения, като се приема, че намаляването му ограничава риска от усложнения.

При изследването му при част от болните са установени различия между стойностите му, съпоставени с други начини за изследване на гликемичния контрол, които все още не са напълно обяснени. Някои предполагат, че тези различия са свързани с неадекватен или лош самоконтрол на гликемията. Според някои проучвания изследването на други показатели като вътреклетъчна гликация на белтъци може да бъде по-добър белег за риск от развитие на усложнения.

Възможните различия между стойностите на кръвната захар и HbA1c вероятно са свързани с факта, че кръвната захар отразява физиологията на захарта в извънклетъчното пространство, а HbA1c – неензимната гликолизация в зависимост от концентрацията на глюкозата в интраеритроцитното пространство.

Налага се да търсят нови методи за гликемичен контрол и изследване на усложненията на ЗД.

Алтернативни методи за гликемичен контрол:

Едни от първите алтернативни маркери за гликемичен контрол са фруктозаминът (ФА) и гликираният албумин, въведени още в края на миналия век [69, 81, 111, 168]. ФА дава възможност за определяне на белтъчното гликиране на всички серумни протеини. Публикуван е за първи път от Johnson Baker през 1983 г., а по късно е модифициран с реагент - Nitroblue Tetrazolium (NBT), като се предполага, че е модел, отчитащ по-добре физиологичната степен на гликиране на белтъците, но трябва да се извършва в кратък период след вземане на кръвната проба, най-много до една седмица [112,168]. Въпреки, че ФА е въведен доста отдавна, все още продължават проучвания за определяне на мястото му сред спектъра на маркери за гликемичен контрол [11, 130, 176].

ФА е гликиран серумен протеин и е избран за метод за изследване, защото дава възможност за измерване на неензимната гликация на белтъците в същия компартимент като плазмената глюкоза и може да обедини промените в кръвната захар. Той е кетоамин, образуван от гликолизацията на общите серумни протеини, основно албумин. Освен това ФА има различно време за търновър спрямо другите таргети за гликация [110]. Според някои проучвания ФА, използван като алтернативен гликемичен маркер за скрининг на диабета, не е възможно да се окаже адекватен показател. 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 [34].

Многобройни са проучванията за приложението на алтернативните биомаркери за гликемичен контрол, но резултатите от тях са противоречиви както за значението им за скрининг за предиабет, така и за оптимизиране на терапията и за определяне на риска от усложнения. Броят на болните не само със ЗД, но и с предиабет нараства, което налага използването на точни биомаркери за ранното диагностициране. Използваните показатели като HbA1c, ФА и гликиран албумин имат някои ограничения като умерена чувствителност и специфичност и не са точни при някои клинични състояния [34]. При съпоставяне на данните от HbA1c и оралния глюкозотолерантен тест с ФА, гликирания албумин и 1-5-дихидриглюцитол при деца и подрастващи до 18-годишна възраст се установява, че алтернативните маркери са лоши предиктори за предиабет, но биха могли да се ползват като втора линия скрининг за диабет при пациенти с наднормено тегло [17].

При анализ на данните на 46 амбулаторни болни със ЗД и на 25 хоспитализирани пациенти е установени, че при първата група има съществена корелация между ФА, кръвната захар на гладно и HbA1c. Само 4 % от хоспитализираните болни са били с нормален серумен HbA1c, докато 39% са били с нормален ФА, като стойностите на двата показателя са отчитали различен аспект на гликемичния контрол. Шест седмици след дехоспитализацията е установено подобряване на нивата на HbA1c, а не на ФА, като авторите предполагат, че ФА не е точен белег за гликемичния контрол и значението му за клиничната картина не е изяснена [69].

При изследване на здрави доброволци и на пациенти със ЗД чрез използване на HbA1c, гликиран албумин, ФА и кръвна захар на гладно е било отчетено, че фруктозамина отговаря на нивата на HbA1c при по ниска цена на изследването, в сравнение с другите гликирани протеини [26]. Серумен фруктозамин остава стабилен най-малко за 10-дневен период, независимо от стойностите на кръвната захар, като по-често той корелира със средните стойности на глюкозата от преходната седмица. Методът е евтин, а техническото изпълнение не е сложно [81].

Някои автори въвеждат допълнително понятие glycation gap (GG) – разликата в белтъчната гликация в интрацелуларното пространство, проследено с HbA1c, срещу екстрацелуларното пространство, изследвано с нивата на ФА [110]. GG е разликата между ФА и HbA1c и се предполага, че може да е полезен за установяване на диабетни усложнения при диабетна нефропатия.

Други проучвания въвеждат понятието гликиран хемоглобинов индекс, различно от гликирания хемоглобин. Някои автори определят GG като разлика между HbA1c и гликирания албумин, като отчитат 95% сходство между гликирания хемоглобинов индекс и GG, използвайки гликирания албумин. Освен това гликирания хемоглобинов индекс е свързан с по-често използване на инсулин при болни със ЗД тип 2 [74].

Някои проучвания сравняват значението на стандартните показатели като кръвна захар на гладно и HbA1c с нетрадиционните маркери за хипергликемия – ФА, гликиран албумин и 1,5-дихидроглюцитол (1,5-AG), като нетрадиционните показатели се свързват с макро- и микроваскуларните усложнения. Според тях ФА и гликираният албумин могат да са прогностични белези, но липсват продължителни перспективни изследвания. Увеличаването и по-широкото използване на тези нетрадиционни тестове би могло да подобри грижата за диабетиците и да даде допълнителна информация на риска за усложнения [87].

Гликираният албумин и ФА (обща гликирани албумини) са алтернативни маркери за гликемичен контрол. Гликираният албумин не е точен при състояния, свързани с търновъра на албумина, като ниски нива на показателя може да има при затлъстяване, вероятно поради повишен катаболизъм и намален синтез от свързаното със затлъстяването възпаление [7].

1-5- дихидроглюцитолът е монозахарид, като някои го приемат за добър маркер за предиабет. Това е показател, който показва, че проксималните тубулни клетки имат по-голям афинитет към глюкозата, отколкото към него. Високото ниво на глюкозата намалява реабсорбцията на 1-5-AG, поради което той се излъчва в повишени нива с урината. По този начин концентрацията му в кръвта е обратно пропорционална с нивата на кръвната захар за по-кратък период от 10-14 дни [7].

Докато HbA1c дава информация за гликемията през последните 3 месеца, то ФА и гликираният албумин са маркери за по-кратък период, което може да е предимство при определяне на антидиабетната терапия или за мониториране на бързи метаболитни промени, които могат да се използват като допълнителни маркери [131]. При изследване на 11 348 възрастни без диабет и 958 със ЗД тип 1 и тип 2, включени в проучването Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) и проследени за 20 г. се отчита, че ФА и гликирания албумин са свързани с диабета, с микроваскуларните усложнения и имат прогностична стойност, сравнима с тази на HbA1c [139].

Интересни са проучванията на връзката на ФА с дислипидемията, като се отчита, че тя увеличава концентрацията му и тестът може да има значение за определяне на пациентите с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания, особено при мъжете [121].

Алтернативен метод за гликемичен контрол при хронично бъбречно заболяване:

Като вече се спомена AGEs са продукти на гликирането. Те са резултат не само на повишените нива на кръвната захар и намаления капацитет на бъбречния клиърънс, но отчитат и прогресията на ХБЗ [56]. Гликолизата се ускорява при хипергликемия и се установява при различни серумни белтъци, включително и албумин. Това дава възможност за използването на гликирания албумин като показател за гликемични контрол за кратък или интермедиерен период [7, 29]. Според някои автори той е по-подходящ от HbA1c за определяне на гликемичния контрол при пациенти с бъбречна недостатъчност, с хемолитична анемия и при тези получаващи хемотрансфузии.

Отчетена е разлика между нивата на ФА и измерения и очаквания HbA1c, като това по-често се е наблюдавало при болни със ЗД и с ХБЗ, като усложненията от ЗД са толкова по-големи, колкото GG е по-положителен [25]. Същевременно някои по стари проучвания обобщават, че ФА не може да се препоръчва като индекс на гликемичен контрол при болни с уремия [107].

Въпреки че HbA1c засега е най-утвърденият показател за мониториране на гликемичния контрол, все още е дискуссионно значението му при диабетици на диализа и при провеждане на лечение с лекарства, стимулиращи еритропоезата (ЕСА) и с желязо. Предполага се, че при такива болни еритроцитите са с променен търновър. При съпоставяне на нивата на HbA1c и ФА при 105 диализно болни със ЗД, лекувани с ЕСА е установено, че стойностите на гликирания хемоглобин трябва много внимателно да се интерпретират, съобразно с факторите които могат да ги променят. Повишаването на ретикулоцитите - белег на еритропоезата, обратно корелира с нивата на HbA1c. Прилагането на ЕСА няма такъв ефект върху стойностите на ФА [59]. Би могло да се обсъжда, че HbA1c не е съвсем точен показател при болни с ХБЗ и ЗД. При такива популации ФА и гликирания албумин са алтернативни маркери за изследване на гликемията. HbA1c подценява гликемични контрол при болни с 4 и 5 стадий на ХБЗ, докато гликирания албумин по-точно отразява гликемията сравнение с ФА [51]. Въпреки, че HbA1c е относително най-близък до средната стойност на кръвната захар, мониторирането на гликемията при болни, лекувани с желязо и/или с ЕСА, вероятно е по-точно с използването на ФА, гликиран албумин или тест с 1,5-AG [80].

При изследване на 19 диализно болни със ЗД и 39 пациенти без захарен диабет се отчита, че четири дневната постоянна глюкозомониторираща система е валидиран маркер за гликемичен контрол при диабетиците и колерира с гликемични контрол и при двете групи. Според авторите HbA1c и ФА корелират при недиабетици, но се отчита слаба връзка на тези показатели при диабетно болните [132]. Според други автори при диабетици на диализа гликираният албумин е по-точен маркер в сравнение със средната скорост на кръвната захар и с HbA1c. Това е важно във връзка и с факта, че лошият гликемичен контрол е независим рисков фактор за развитие на атеросклероза при тези болни [34, 83].

Има данни, че ФА и кислородния стрес са значително повишени при диабетици с ХБЗ, но липсват проучвания за значението на ФА при недиабетно болни със или без ХБЗ. При изследване на 1891 недиабетици с ХБЗ се установява, че концентрация на ФА негативно корелира с гломерулната филтриция. Това дава основание да се предполага,

че лекото повишаване на ФА при недиабетици може да се свърже с появата на ХБЗ [122].

Точната диагноза и мониторирането на ЗД са свързани с намаляване на усложненията от заболяването. ФА и гликираният албумин биха могли да са подходящи тестове при пациенти с бързопроменяща глюкозна хомеостаза, с еритроцитни нарушения и бъбречни заболявания. Част от проучванията дават предимство на гликирания албумин в сравнение с ФА [122].

Мониторирането на гликемичния контрол при диализни болни с HbA1c може да не е точно поради анемията и еритропоетиновата терапия. Гликираният албумин е алтернативен метод, но все още не се използва широко в практиката. В проучването German Diabetes and Dialysis Study е отчетено, че при болните с високи нива на гликирания албумин в началото се отчита 42% по-висока смъртност за 4 годишен период, като се обобщава, че повишените нива на този показател са свързани с повишена смъртност при болни с диабет на диализно лечение [21, 88].

В проучването Glicemic Indices Dialysis Evaluation (GIDE) се сравнява значението на HbA1, обикновената стойност на кръвната захар, гликираният албумин и ФА при болни на хемодиализа и на перитонеална диализа със ЗД, като болните с нисък гликиран хемоглобин са били с по-високи дози на еритропоетин, на лечение с желязо и с по-изразен анемичен синдром. Стойностите на кръвната захар са с най-изразена интрагрупова вариабилност, докато отклоненията са умерено изразени при другите индекси и са най-малки при HbA1c, което дава основание да се приеме, че той може да се използва при тази популация [167]. Въпреки че стойностите на HbA1c се различават при болни с ХБЗ, все пак той остава един от основните маркери за гликемичен контрол.

Може да се обобщи, че въпреки, че HbA1 е златен стандарт за мониториране на гликемията, той не винаги е точен показател при диабетици с ХБЗ. Въведени са алтернативни методи за гликемичен контрол като ФА. Гликиран албумин, GG, 1,5 – AG, гликиран хемоглобинов индекс, но все още проучванията не са достатъчни, за да определят ясно значението на отделните тестове.

9. Недиабетно бъбречно заболяване

9.1. Честота:

Клиничната нефропатия при пациентите със ЗД може да бъде хистологично свързана с развитие на диабетна гломерулопатия, недиабетно бъбречно заболяване (НДБЗ) или комбинация от двете. ДН не е единствената причина за ХБЗ при пациенти със ЗД. Нараства честотата на НДБЗ сред диабетиците [9, 14-15, 37, 97, 142, 170]. При пациенти с над 10-годишна история на ЗД тип 1, НДБЗ е рядко клинично състояние с честота 2-3%. Разпространението на НДБЗ при пациенти със ЗД тип 2 варира в широки граници от 10% до 85% [8, 9, 14, 97-98, 142, 178-179]. В различни проучвания разпространението на НДБЗ е отчетено като 22% при бялата раса и 26,7% сред азиатците [15, 37]. По данни на повечето автори, честота на НДБЗ насложено върху ДН варира между 7.8% - 48.9% [63, 97, 98, 178-179]. Някои проучвания не откриват пациенти със смесени лезии [8, 9, 10, 17, 26], докато други съобщават, че не са изолирани НДБЗ. Трудно може да се определи причината за липсата на изолирани НДБЗ или смесени лезии в тези проучвания [11, 15, 24, 47]. Голямата вариация в честота на НДБЗ, най-вероятно се дължи на различията в методологията на изследването и критериите за провеждане на ПББ при диабетиците в отделните клинични центрове [8, 47, 52, 149]. При пациенти с диабет липсват стандартизирани критерии за провеждане на ПББ. Докато някои НДБЗ са относително чести при пациенти със ЗД с атипично протичане на заболяването, то те са изключително редки сред тези пациенти, при които ЗД следва своя естествен ход. Това е илюстрирано в многоцентрово проучване, проведено в Италия, сравняващо честотата на бъбречните заболявания, различни от диабет, сред центровете с „ограничена“ спрямо тези с „неограничена“ биопсична политика [15]. В центровете с „ограничена“ политика, бъбречните биопсии са показани само когато се подозира друго бъбречно заболяване (т.е. е налице хематурия, нефротичен синдром, протеинурия при липса на ДР, бърза прогресия на бъбречната недостатъчност или необяснима бъбречна недостатъчност) [5, 9, 15]. Центровете с „неограничена“ политика извършват ПББ, ако пациентът има протеинурия > 500 mg/24 h и/или хематурия и/или бъбречна дисфункция. Въпреки това, дори в центровете с „неограничена“ политика, ако ДН изглежда очевидна (дълъг период на диабет, наличие на други хронични усложнения от диабет - ДР, полиневропатия, васкулопатия и др.), ПББ не се извършва. Това проучване показва, че в центровете с „ограничена“ политика, честота на изолираните другите бъбречни заболявания е 38% от случаите, а на тези свързани с ДН – съответно 33%. Въпреки че са изключени всички пациенти с очевидна ДН от кандидат биопсичния пул, в центровете с „неограничена“ биопсична политика е установено, че при 73% от биопсираните пациенти със ЗД тип 2

е налице ДН. От тях ДН е била единствената патологична диагноза при 51% от бъбречните биопсии и е била свързана с друго гломерулно заболяване в 22% от случаите. В останалите 27 % се наблюдават нефросклероза или други гломерулни заболявания. Следователно, когато протичането на заболяването е нетипично и има клинично подозрение, че може да е налице друго НДБЗ, вероятността това да бъде потвърдено от ПББ е висока. В тези случаи провеждането на бъбречната биопсия е не само оправдано, но и клинично показано [15,16].

9.2. Преглед на аутопсионните находки:

Развитието на ДН при болни със ЗД тип 2 вероятно често е свръхдиагностицирана. Преди повече от 20 години при анализ на аутопсионен материал при диабетици е установено, че се наблюдават недиагностицирани гломерулонефрити при пациенти със ЗД тип 2 [163]. През 1992 г. Waldherr et al. извършват аутопсия на 205 пациенти със ЗД тип 2 и откриват НДБЗ в 0.4% и ДН в 79% от случаите. Това проучване след смъртта, както и това на Biesenbach et al., които включват предимно пациенти с краен стадий на бъбречно заболяване, вероятно е довело до подценяване на НДБЗ при пациенти със ЗД тип 2. Причината за това е, че в някои случаи на ТБН, НДБЗ не могат да бъдат различени от ДН, в хистологичния материал присъстват предимно напреднали гломерулни и тубулоинтерстициални лезии. Това заключение се подкрепя от констатациите на Biesenbach et al., които не откриват никакви НДБЗ, а само ДН и съдова нефропатия в тяхното проучване [63].

От друга страна, клиничното начало на ДН се характеризира с наличието на микроалбуминурия или намаляване на скоростта на гломерулната филтрация (eGFR). Въпреки това, едно аутопсионно проучване показва, че пациенти със ЗД, при които липсва микроалбуминурия, при хистологичен анализ на бъбречна тъкан е налице ДН, която клинично е била недиагностицирана [97].

Предполага се, че хистопатологична оценка на бъбречните заболявания при диабетици може да доведе до относително висок дял на НДБЗ, които са били диагностицирани като ДН. Затова е изключително важно да се разбере по-добре спектъра на бъбречните заболявания при пациенти със ЗД, което ще доведе до различни терапевтично и прогностични последици [97]. Поради факта, че не се извършва бъбречна биопсия на всички пациенти със ЗД тип 2 с бъбречно засягане, никога няма да

се разбере истинското разпространение на НДБЗ, както и на ДН при пациенти със ЗД тип 2 [63].

9.3 Патогенетични механизми на НДБЗ при диабетици:

Механизмите, свързани с развитието на НДБЗ при пациенти със ЗД, остават все още неизяснени [10, 20]. Към настоящия етап не е уточнено дали НДБЗ е съпътстващо ДН събитие или клинично състояние, което е резултат от имуно-физиологични аномалии на гломерулната базална мембрана. Смята се, че гломерулосклерозата е предразполагащ фактор и съществуващите гломерулни промени улесняват субепителните имунни реакции. Текущите познания предполагат, че хипергликемията, продуктите на напредналото гликиране, имунните комплекси и други биохимични промени в диабетната среда активират бъбречните клетки чрез стрес-сигнализиране, което води до отделяне на протеин киназа, повишено образуване на клетъчните адхезионни молекули и освобождаване на провъзпалителни цитокини с последващо гломеруларно-левкоцитно инфилтриране. Редица модифицирани протеини, като окислени липопротеини с ниска плътност, които се образуват при диабет, са потенциално имуногенни, което води до образуване на имунни комплекси и последващо възпаление. Циркулиращи имунни комплекси и гломерулни IgG депозити, по-специално проинфламаторните подтипове IgG1 и IgG3 изотипи са разпознати в диабетични експериментални модели. Повишената експозиция на антигенни клетъчни компоненти и предшествващи гломерулни изменения могат да благоприятстват имунната реакция в субепителното пространство. Въпреки това, някои автори не откриват разлика в разпространението на НДБЗ между пациенти със и без диабет и предполагат, че съвместното съществуване на гломерулонефрит в диабетичния бъбрек може да бъде само случайно [47].

9.4 Индикации за ПББ при диабетици:

През последното десетилетие се установи, че ДН не е единственото бъбречно увреждане при диабетиците, като зачестяват проучванията за значителна честота на недиабетни бъбречни заболявания сред тях [14, 63, 143]. Видът на хистологичните бъбречни промени е трудно да бъде предвиден само по клинични и лабораторни данни. Точното им определяне може да се постави само след морфологичен анализ на

бъбречната тъкан. Все още ПББ се препоръчва при пациенти, при които се очаква да имат и недиабетни бъбречни промени. С ПББ могат да се разграничават 3 типа изменения – характерни за ДН, самостоятелно изявено недиабетно бъбречно засягане и насложени други изменения върху ДН [9, 14, 15, 35, 42, 47, 51, 142, 149]. Докато при пациентите със ЗД тип 1 над 95% от бъбречните промени са свързани с ДН, то резултатите при ЗД тип 2 са често хетерогенни, като според различните проучвания от 10 до 85% от болните могат да имат само недиабетни бъбречни промени или съчетание на двата типа изменения [8, 15, 52, 60, 90, 153, 166, 178]. При пациенти със ЗД тип 2 може да има различен интервал от време между началото на заболяването и времето на диагностициране; следователно точната възраст на началото на диабета обикновено не е известна и трудно може да бъде предвиден типът на бъбречната увреда. ПББ е единственият метод, който точно разграничава бъбречните изменения при ЗД тип 2, но тя все още не се прилага рутинно [35, 42-43, 47, 153].

Въпреки, че рисковете свързани с бъбречната биопсия при пациенти с диабет не са по-високи, отколкото при пациенти без диабет, биопсията на бъбреците остава инвазивна процедура, а в клиничните условия тя трябва да бъде препоръчана при определени индикации [14,15]. При ЗД тип 1, началото на протеинурия при пациенти с по-малко от 5 години продължителност на заболяването и липсата на други хронични усложнения на диабета, често се счита за индикация за бъбречна биопсия. При пациенти със ЗД тип 2, където продължителността на заболяването може да не е сигурна, други критерии са полезни при насочването към бъбречна биопсия. Показанията за ПББ в тези случаи са остро възникване или влошаване на бъбречно заболяване, наличие на активен уринен седимент – еритроцити (акантоцити), клетъчни цилиндри и признаци или симптоми на друго системно заболяване [15]. Според други авторите, клиничните индикации за очакване на недиабетни бъбречни промени включват давност на ЗД тип 2, липса на диабетна ретинопатия (ДР), нетипичен ход на ДН във времето, поява на хематурия или на нефрозен синдром [9, 63, 64, 155, 166].

Препоръките на KDOQI определят състояния, при които следва да се изключи недиабетно увреждане на бъбреците. Те включват липса на ретинопатия, бързо влошаване на бъбречната функция, значимо увеличаване на протеинурията за кратък период или поява на нефрозен синдром, рефрактерна хипертония, активен уринен седимент или белези на системно заболяване, както и ограничаване на гломерулната филтрация с над 30% след започване на лечение с блокери на ренин-ангиотензин-алдостероновата система [9, 25].

Някои автори включват към критериите за ПББ при болни със ЗД тип 1 наличието на еритроцитурия, необичайна промяна в бъбречната функция, липса на ретинопатия, наличие на имунологични промени. Сходни са критериите за провеждане на ПББ при ЗД тип 2, определени от други автори. Ранната поява на масивна протеинурия при продължителност на ЗД тип 2 под 5 години, бързо влошаване на бъбречната функция, намалена бъбречна функция без значима протеинурия и активен уринен седимент, често се свързват с изява на недиабетни бъбречни промени. Допълнителни фактори, предполагащи наличие на недиабетни промени могат да бъдат възрастта при появата на ЗД тип 2, липса на ретинопатия, умерена протеинурия и кратка давност на ЗД [8, 9, 47, 90, 142, 166]. Към индикациите за ПББ при ЗД някои автори включват и поява на остро бъбречно увреждане, както и необяснимо влошаване на бъбречната функция [144, 153, 166]. Установени е, че диабетната ретинопатия е единственият независим фактор, отговарящ на критериите на KDOQI за ДН [47, 148].

Според други проучвания, ЗД тип 2 дори при давност над 10 години и наличие на ДР не изключва възможността за недиабетни бъбречни промени. Критериите за провеждане на ПББ при такива болни могат да са внезапно поява на масивна протеинурия при предходна нискостепенна дори при липса на активен уринен седимент [96].

9.5. Морфологични находки при диабетици:

Разнопосочни са данните за вида на недиабетните изменения, отчетени с ПББ. Някои автори определят, че най-честите биопсично установени диагнози са IgA нефропатия [8, 9, 15, 42, 149] мембранозен гломерулонефрит [37, 97] и огнищно - сегментна гломерулосклероза [9, 31, 34]. Според други съобщения, интерстициалният нефрит е водещата бъбречна патология [142], а трети определят висока честота на огнищно-сегментната гломерулосклероза, следвана от гломерулонефрит с минимални изменения, IgA нефропатия и мембранозен гломерулонефрит [7, 18, 21, 27]. Според азиатските проучвания IgA нефропатията е най-разпространеното НДБЗ, докладвана в мета-анализи и вероятно отразява високия процент проучвания в азиатските популации [8, 14, 37, 42, 52, 97, 453, 178-179], докато ОСГС е най-разпространеното НДБЗ в съответствие с наблюденията в проучвания, проведени сред предимно европейски популации, в САЩ и в Нова Зеландия [8, 14, 37, 42, 97, 153]. При пациентите с комбинирана патология най-честото заболяване насложено върху диабетната

нефропатия е интерстициалния нефрит [37].

Според повечето проучвания, бъбречните увреждания при пациентите със ЗД тип 1 по-вероятно се дължат на ДН, което е доста различно от патологичните модели, наблюдавани при пациенти с ЗД тип 2. Въпреки това едно проучване проведено в Китай почти половината (49,2%) от пациентите със ЗД тип 1 са имали НДБЗ. IgAN и MN са водещите причини за НДБЗ при пациенти със ЗД тип 1, което е в съответствие с епидемиологията на гломерулопатиите в Китай [97].

Мембранозната гломерулопатия е честа причина за първично гломерулно заболяване при диабетици. Тя може да възникне или като изолирана лезия, или да е насложена върху ДН. Нефротичният синдром се появява късно в хода на ДН, което показва напреднал стадий на гломерулно увреждане. Бързото начало на нефротичния синдром при пациенти с диабет може да бъде резултат от ускорена прогресия на ДН или от развитие на друга първична гломерулопатия като мембранозна, минимална промяна или IgA нефропатия. Съвместното съществуване на диабет и мембранозна нефропатия може да представлява както диагностични, така и терапевтични предизвикателства за лекуващия лекар. Кортикостероидите и други имunosупресивни лекарства като калциневриновите инхибитори могат да влошат гликемичния контрол и да изострят инфекциите при диабетици. В ретроспективен анализ на ПББ на 134 диабетици, проведен в един клиничен център в Индия е установена мембранозна нефропатия при 16 от тях, като 12 са били със самостоятелна изява на гломерулопатията, а при четири тя е била комбинирана с ДН. Авторите наблюдават лош отговор при прилагане на схемата на Понтичели за лечение на мембранозния гломерулонефрит, докато терапията с микофенолат мофетил е свързана с по-редки странични ефекти дори и в сравнение с прилагането на калциневринови инхибитори. Въпреки това тя е спряна при доста пациенти поради нежелани реакции, развили се по-късно в хода на лечението [10].

Сравнени са и клиничните и лабораторните параметри на пациенти с ДН и такива с мембранозна нефропатия при пациенти със ЗД без ДР. Установено е, че в сравнение с пациентите с ДН, пациентите с мембранозна нефропатия са имали значително по-високи нива на HDL и холестерол, което е в съответствие с характеристиките на мембранозната нефропатия. Междувременно, нивото на серумния креатинин при пациенти с ДН е значително по-високо от това при пациенти с мембранозна нефропатия. Тези различия обаче са сравнително незначителни, въпреки статистическата разлика и не са достатъчно издържани, за да осигурят ефективни показатели за диференциалната диагноза на тези два вида заболявания.

9.6 Анализ на клинично-лабораторните показатели при диабетици според различните проучвания

В повечето проучвания кратката продължителност на ЗД тип 2, съхранените инсулинови резерви, по-ниските нива на HbA1c и липсата на диабетна ретинопатия са значителни рискови фактори за НДБЗ. Независимостта от инсулиновата терапия е изследвана в няколко проучвания и определена като значителен предиктор само за НДБЗ [35]. Според някои проучвания ниските серумни нива на HbA1c се свързват значително с НДБЗ [143]. Други не установяват такава закономерност [16].

В повечето публикации по-кратката продължителност на диабета е установена като значим предиктор на НДБЗ [8, 9, 14, 19, 35, 97, 142-143, 153], докато по-голяма продължителност на диабета (продължителност > 7 години) е предиктор за ДН. Установено е, че с всяка изминала година от появата на ЗД, вероятността за присъствието на НДБЗ намалява с 5% [142]. От изключително значение за клиницистите е факта, че наличието на ДН не изключва НДБЗ и при клинично подозрение е необходимо провеждането на ПББ.

Възрастта и полът не са значими предиктори за НДБЗ в повечето от проучванията [14, 16, 37, 97, 142]. Според някои автори обаче напредналата възраст е рисков фактор за НДБЗ. [9, 47, 142-143], а според други проучвания е индикатор за ДН [8]. Единствено в проучването на Wilfred et al. е установено, че НДБЗ се асоциират с женския пол, докато в останалите проучвания не е открита зависимост между пола и морфологичте изменения при диабетици.

Хипертонията често съпътства пациентите със ЗД тип 2, но неговата прогнозна стойност за НДБЗ е различна. Хипертонията е установена като значим предиктор на НДБЗ в проучвания на някои автори [10,], докато други проучвания не потвърждават това [14, 15, 18, 23-24, 47].

Морфометричните променливи (тегло, височина, индекс на телесната маса) не се определят като значими фактори в прогнозата на НДБЗ в публикувани проучвания [9, 10, 14, 16, 15, 18, 23, 24].

Съществуват вариации в анализите за значението на протеинурията като диференциален индикатор на ДН от НДБЗ. Според някои проучвания протеинурията не може да бъде използвана за предиктор на НДБЗ [9, 10, 15-16, 23, 35, 37]. Според други автори обаче по-ниската протеинурия се асоциира с НДБЗ [8, 9, 14, 18, 47, 143], което е

противоположно на трети, които свързат по-високата протеинурия с НДБЗ [142]. Разнопосочни са данните на различни автори за значението на бъбречната функция (определена чрез нивата на серумния креатинин и/или чрез скоростта на гломерулна филтрация) като индикатор на НДБЗ [9, 10, 15, 18, 23-24, 37, 47]. Някои проучвания, показват асоциация на НДБЗ с по-ниски нива на серумния креатинин [9, 14, 16, 97] докато други констатират това за по-висок серумен креатинин [142-143, 153]. Разнообразните резултатите 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.

Хематурията е свързана с НДБЗ. Според повечето автори, тя е рядка при ДН, но съпътства доста от гломерулните заболявания. Следователно хематурия може да бъде полезен диференциален индикатор на НДБЗ и ДН. Това се потвърждава от резултатите на различни проучвания [8, 9, 16, 97, 143]. Други автори и проучвания не подкрепят тези констатации [35, 47].

Нивата на серумния белтък и албумина не бяха определени като значими предиктори на НДБЗ в повечето проучвания [10, 14, 18, 23-24, 37]. Само Suzuki et al. са установили по-ниски нива на серумни протеини като значителен предиктор за НДБЗ [15].

Някои автори определят значителни предиктори на НДБЗ при пациенти със ЗД тип 2 по-високите серумни нива на хемоглобина [6], по-високата фракция на изтласкване на сърцето, по-ниска дебелина на интима-медия и по-малки плаки на каротидните артерии [9].

Редица проучвания показват, че ДР може да бъде полезна за разграничаване на ДН при пациенти със ЗД тип 2 от други бъбречни заболявания [9, 14, 47, 57, 92, 143, 153]. ДР е полезен показател за клиничната диагноза на ДН. 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. ДР е важен индикатор за ДН [16, 19, 32, 37-38, 47, 97, 153]. Според едно проучване, проведено в Индия ДР е предиктор за ДН в протеинуричните диабетици. Друго проучване проведено в Китай показва, че ДР е свързана с ДН, само при пациенти с албуминурия, но не и при нормоалбуминурични пациенти [97]. При пациенти с диабет с протеинурия, ако ДР липсва, понякога е трудно да се диференцира ДН или друга гломерулопатия без бъбречна биопсия.

Невинаги връзката на диабетната нефро- и ретинопатия е категорична. Докато диабетната ретинопатия се доказва почти при всички пациенти със ЗД тип 1, то само 50-60% от болните с протеинурия и със ЗД тип 2 са с такива очни изменения. Не винаги липсата на ДР е белег за недиабетни бъбречни изменения или за доказване на ДН [22, 36, 37, 41, 46-47]. Липсата на очни промени налага допълнително изследване за изключване на недиабетни гломерулопатии, но наличието ѝ също не отхвърля възможността за недиабетни промени в бъбреците. Според повече от проучванията, наличието или липсата на диабетна ретинопатия винаги може да определи точната характеристика на бъбречните промени и при определени индикации те трябва да се уточняват с ПББ [6, 9, 92].

В популационно проучване в Корея е анализирана връзката на ДР с ДН. Установено е, че рисковите фактори за разгърната ДН са били давност на ЗД, висок гликиран хемоглобин, лошо контролирана систолна хипертония, нивото на общия холестерол и серумния креатинин. Авторите обобщават, че пролиферативната ретинопатия е свързана с проявена нефропатия [57]. Според резултатите на друг колектив, албуминурията е рисков фактор за ДР при ЗД тип 1, но не и при ЗД тип 2, като степента на нефропатията корелира с ДР [3, 27]. Анализът на относително малки групи болни също потвърждава, че наличието на ДР най-често е свързано с ДН, като липсата ѝ винаги доказва недиабетни бъбречни промени [92].

В ретроспективно проучване проведено в Първа Университетска болница в Пекин са сравнени клиничните и лабораторни характеристики на пациентите с ДН без ДР, в сравнение с „класическата“ ДН, т.е. тези с ДР. В сравнение с пациентите с ДР, пациентите без ДР имат по-ниско ниво на серумния креатинин и по-ниска честота на диабетна полиневропатия, което предполага, че пациентите без ДР имат по-малко сериозно бъбречно увреждане и по-малко диабетни усложнения. Това е в съответствие с друго проучване, което установява, че при пациенти със ЗД периферната невропатия се свързва с ДР. Установено е също, че нивото на албумин при пациенти без ДР е значително по-високо от това при пациенти с ДР [92].

Едно ретроспективно проучване, проведено в болница „Cunyu Sabral” в Лисабон, Португалия, включващо 236 пациенти със ЗД при които е проведена ПББ, показва, че изолирана ДН е установена в 53%, изолатирано НДБЗ в 38% и НДБЗ, насложено върху ДН при 9% от пациентите. Основната индикация за ПББ при трите групи е високостепенната протеинурия. При пациентите с изолирано НДБЗ и НДБЗ насложени върху ДН влошената бъбречната функция и хематурията са били честа индикация за

бъбречна биопсия. Най-честите НДБЗ при тези пациенти са фокалните сегментарни гломерулосклерози и мембранозна нефропатия. Пациентите с изолирана ДН са по-млади, показват по-голяма продължителност на ЗД и имат по-честа ретинопатия. Разпространението на микрохематурията е по-често при пациенти с изолирани или насложени НДБЗ [51].

Според друго проучване проведено в изследователската болница в Анкара, Турция са включени 71 пациенти със ЗД тип 2, които са подложени на ПББ, поради клинично подозрение за НДБЗ. Въз основа на хистопатологично изследване на бъбречни проби, 47.9% от пациентите са имали ДН, а 52.1% - НДБЗ. Показания за бъбречна биопсия са липсата на ретинопатия при 43.7% от пациентите, бързото влошаване на бъбречната функция при 36.6% и наличие на хематурия при останалите 19.7%. Групирането на патологичните находки в групата на НДБЗ като гломерулни и негломерулни заболявания показва, че 65% от пациентите са имали гломерулни заболявания, от която фокалната сегментарна гломерулосклероза е най-често срещана, а 35% имат негломерулни заболявания. Разпространението на диабетната ретинопатия е по-високо в групата ДН, отколкото в групата на НДБЗ. В групата на ДН протеинурия е била значително по-тежка, а продължителността на ЗД е по-дълъг сравнение с групата на НДБЗ [37].

В университетската болница "Дубрава", Загреб, Хърватия ретроспективно са проследени ПББ на 80 болни със ЗД. Най-честата индикация за бъбречна биопсия е била нефротичен синдром при 80% от пациентите, а при 75% от тях бъбречна недостатъчност (остра, бързо прогресираща или необяснима хронична). При 29 пациенти са установена изолирани НДБЗ, 37 – изолиран ДН, а 14 пациенти са имали смесени лезии. Най-честото НДБЗ е било мембранозна нефропатия, последвана от IgA нефропатия и фокална сегментарна гломерулосклероза. Пациентите с НДБЗ са с по-кратка продължителност на диабета, по-рядко зависими при инсулинова терапия, имат по-нисък серумен HbA1c и са имали по-рядко диабетна ретинопатия в сравнение с пациентите, които нямат НДБЗ [63].

В друго проучване проведено в Бангалоре, Индия е направен ретроспективен анализ на ПББ на 93 болни със ЗД. Двадесет и трима пациенти (24.73%) са имали изолирано НДБЗ, 41 болни (44.08%) са имали смесени лезии (комбинация на НДБЗ със ДН), а 29 пациенти (31.18%) са имали изолирана ДН. Хроничният интерстициален нефрит е най-честото НДБЗ, а мембранозният гломерулонефрит е най-разпространеното гломерулно НДБЗ. По-кратка продължителност на диабета,

отсъствие на ретинопатия, наличие на микроскопска хематурия и активен уринен седимент са маркери, свързани с НДБЗ при диабет тип 2 и са основни индикатори за провеждане на биопсия. Женският пол е по-често срещан при ЗД тип 2 с НДБЗ според това проучване [52].

При ретроспективно проследяване на ПББ на пациенти със ЗД от три болници в Окланд, Нова Зеландия, включващо 263 болни е установено, че 94 пациенти (36%) са имали само ДН, 97 (37%) са имали смесени лезии, а 72 (27%) са имали само НДБЗ. Пациентите само с НДБЗ се различават по това, че имат по-кратка продължителност на диабета, липсва ретинопатия и са с по-висока eGFR по време на бъбречната биопсия, в сравнение с ДН самостоятелно и смесените групи. Липсата на диабетна ретинопатия е силно свързана с НДБЗ. Сред пациентите с НДБЗ - фокална сегментна гломерулосклероза е най-честата недиабетна патология, последвана от интерстициален нефрит, постинфекционен гломерулонефрит, мембранозен гломерулонефрит и гломерулонефрит с минимални изменения [153].

В едно ретроспективно проучване проведено в Болница „Дел Мар“, Испания са анализирани вида на гломерулните лезии при пациентите с диабетна нефропатия и са съпоставени със степента на протеинурията. Установено е, че най-честата диабетна лезия сред тях е мезангиалната експанзия и, че тя се наблюдава, когато протеинурията се повиши. Освен това според проучването нодуларната експанзия при пациентите с ДН и нефротична протеинурия е по изразена сравнение с тези с ненефротична протеинурия [9].

В едно Корейско проучване след провеждане на ПББ при диабетниците е осъществена бъбречна цветна доплер ултрасонография при всички пациенти, за да се провери за усложнения, свързани с процедурата. При по-голяма част от пациентите липсват усложнения. Най-често срещаното усложнение е периреналното кървене, последвано от артериовенозна фистули. Всички усложнения отшумяват спонтанно в рамките на 48 часа. Разпространението на усложненията не се различава значително между пациентите със самостоятелна ДН, НДБЗ и тези с комбинирана патология [14].

9.7. Прогноза:

Прогностичното значение на бъбречната биопсия и нейната полза при идентифициране на НДБЗ е важен въпрос, който трябва да се вземе под внимание при пациенти със ЗД [37]. Според някои автори болните със ЗД тип 2 с недиабетни

морфологични промени са със значително по-добра прогноза в сравнение с тези с биопсично доказана ДН, като значение има ранното започване на лечение на недиабетното заболяване. [8, 9, 14, 15, 35, 47, 142, 153]. В едно проучване проведено в Анкара, Турция е проследена бъбречната функция чрез eGFR по време на ПББ и 12 месеца след това при пациентите с НДБЗ, ДН и комбинирана патология. В сравнение с пациентите с хистологични данни за ДН, при пациентите с НДБЗ и с комбинирана патология след проведено лечение, eGFR се подобрява на 12 месец. Броят на пациентите достигнали до ТБН е по-голям при изолираната ДН, в сравнение с останалите групи [37].

Можем да обобщим, че отдиференцирането 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.

III. 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 изолирано НДБЗ, с хистологични данни за ДН и при тези с комбинирана патология.
3. Да се съпоставят серумните и уринните нивата на продуктите на неензимно гликиране и антителата насочени срещу AGEs при пациенти със захарен диабет и при контролна група пациенти.
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 като неинвазивен диагностичен маркер за диабетна нефропатия.

IV. А. Материал и методи-I:

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 01.01.2012г. до 30.05.2019г. От тях 63 са със Захарен диабет, диагностициран преди провеждането на ПББ.

2. Индикациите за провеждане на бъбречна биопсия при диабетниците 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.

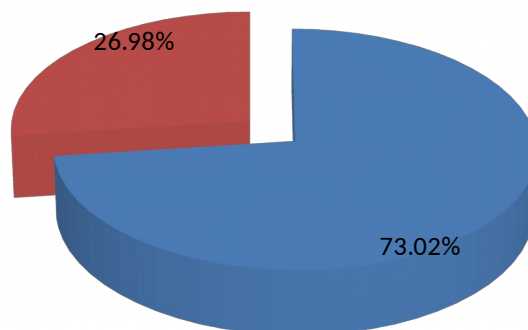
Прилагани са следните изключващи критерии по отношение на пациентите:

1. Отказ от провеждане на ПББ.
2. Възраст под 18г.
3. Кортикоиндуциран ЗД.

а. 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. 2.)



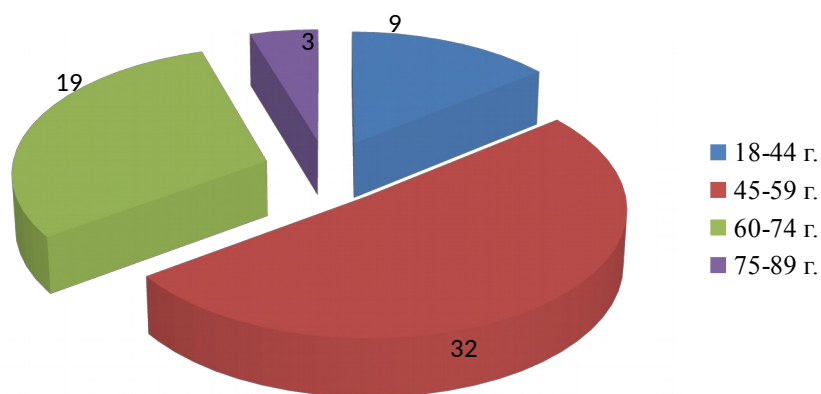
Фиг. 2. *Разпределение на пациентите според пола*

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 статическото 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.3).



Фиг. 3. Разпространение на пациентите във възрастови групи според СЗО

в. 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:

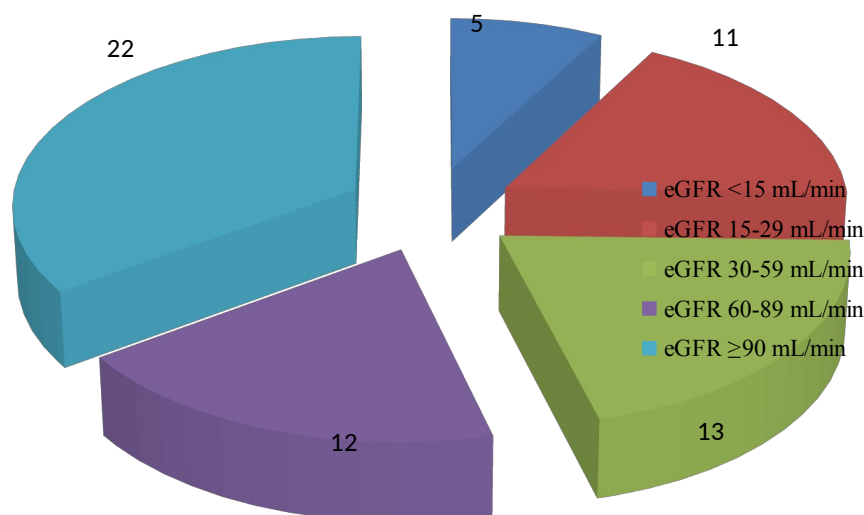
Лабораторните изследвания при пациентите със ЗД диабет са извършени в Отделение по Клинична лаборатория на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ и включват: пълна кръвна картина (ПКК) (еритроцити, хемоглобин, левкоцити, диференциално броене на левкоцити, тромбоцити), биохимични изследвания (креатинин, урея, пикочна киселина, общ белтък, серумен албумин, аспартат аминотрансфераза (ASAT), аланин аминотрансфераза (ALAT), гама–глутамил 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.1).

Табл. 1. Стадиране на ХБЗ според eGFR

eGFR (mL/min/1.73m ²)		
G1	над 90	нормална или висока
G2	60-89	леко намалена
G3a	45-59	леко до умерено намалена
G3b	30-44	умерено до силно намалена
G4	15-29	силно намалена
G5	<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. (табл.2, фиг.4).



Фиг. 4 Разпределение на пациентите според стойностите на eGFR

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

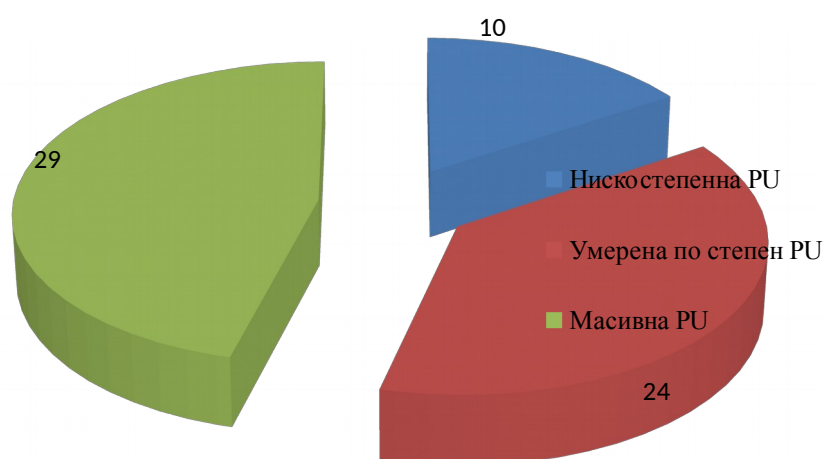
Степени на албуминурия при ХБЗ според K/DIGO-2012				
Албуминурия		Съотношение албумин/креатинин в урината		
Категория	(mg/24ч.)	ACR (mg/mmol)	PCR (mg/g)	
A1	под 30	под 3	под 30	нормално или

				леко повишена
A2	30-300	3-30	30-300	умерено повишена
A3	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.

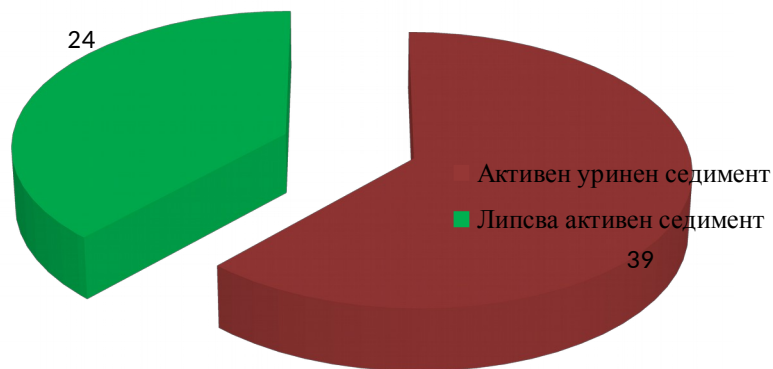
В зависимостта от стойността на протеинурията проучваните пациенти бяха разделени в следните групи: с нискостепенна протеинурия (от 0,15 до 0,5 g/d) са 10 пациенти (15,9%); с умерена по степен протеинурия (от 0,5 до 3,5 g/d) са 24 пациенти (38,1%) и с масивна по степен протеинурия (над 3,5 g/d) са 29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



Фиг. 5. 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. 6).



Фиг. 6. *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 светлиномикроскопското изследване (СМ) включва оцветяване с хематоксилин-еозин (HE), с трихром по Masson, с перйодна киселина – Shiff (PAS), сребърна импеграция по Wilder.

Обработката на хистологичните материали за имунофлуоресцентното изследване (ИФ) включва инкубация на хистологичния материал със свързани с флуорохроми моноспецифични анатичовешки 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 Tervaert 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 IIa. Морфологичните изменения в този клас съответстват на термина "дифузна диабетна гломерулосклероза".

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

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

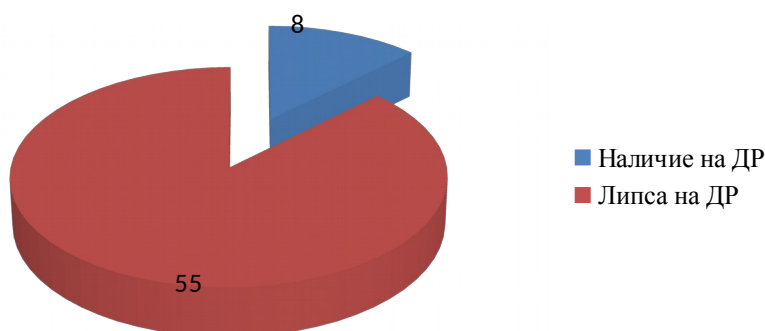
Изменения като хипертрофия на мезангиалният матрикс, мезангиоклетъчна пролиферация, интерстициална инфилтрация и интерстициална фиброза са категоризирани полуколичествено, като липсва на такива е отчитана с 0, леката степен на изразеност като 1, умерена степен на изразеност като 2 и силната степен на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

Отчетени бяха наличие на склерозиралите гломерули, наличие на полулуния, задебеляване на гломерулна 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:

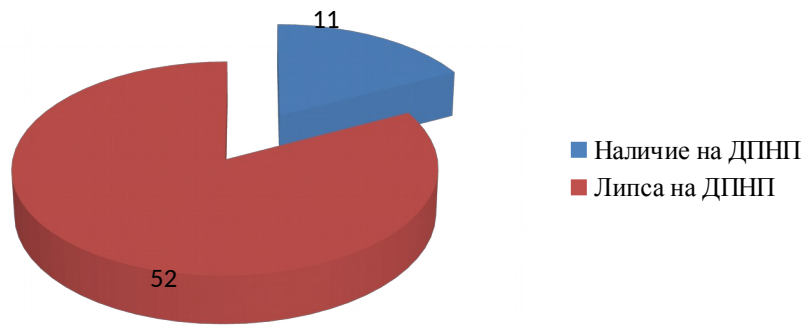
При всички биопсирани пациенти със ЗД е провеждан скрининг за диабетна ретинопатия чрез провеждане на офталмоскопия. Диагностицирането на ДР се осъществява съгласно Международните клинични препоръки за ДР, издадени от Международната конференция по офталмология. Резултатите са определени като липса на 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. 7).



Фиг. 7. *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. 8).



Фиг. 8. *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, урикоинхибиращо, 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 биопсирани пациенти 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. – самостоятелна ДН. Сравнени са демографските характеристика, лабораторните и морфологичните находки при тези групи.

2.7. Статистически методи за обработка на резултатите:

Данните са въведени и обработени със софтуерни пакети Microsoft Excel[®], 2007 и GraphPad Prism[®], ver.5.00.

За представяне и оценка на достоверността на получените резултати са прилагани следните статистически методи: дескриптивен 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 χ^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 $p < 0.05$.

Б. 1. Материал - II

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 2016г. до месец май 2017г. При пациентите са проведени стандартни клинични и клинико-лабораторни изследвания, като са заделяни 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 продуктите 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:

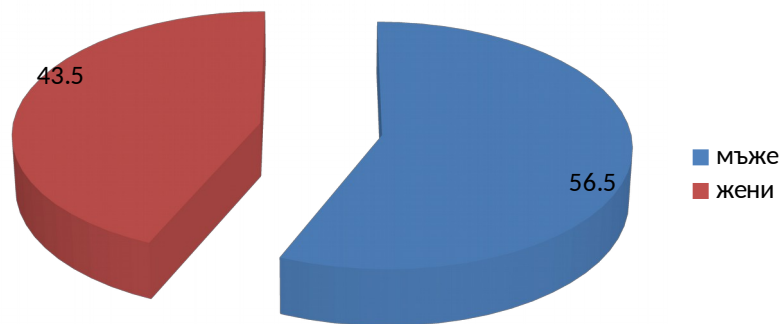
1. Нежелание за участие в изследването
2. Възраст под 18г.

3. 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.9.)

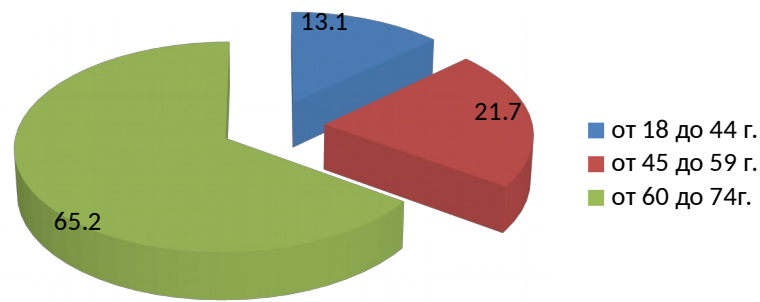


Фиг. 9. Разпределение на пациентите според пола

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.10).



Фиг.10. 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°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

2.2 . 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.

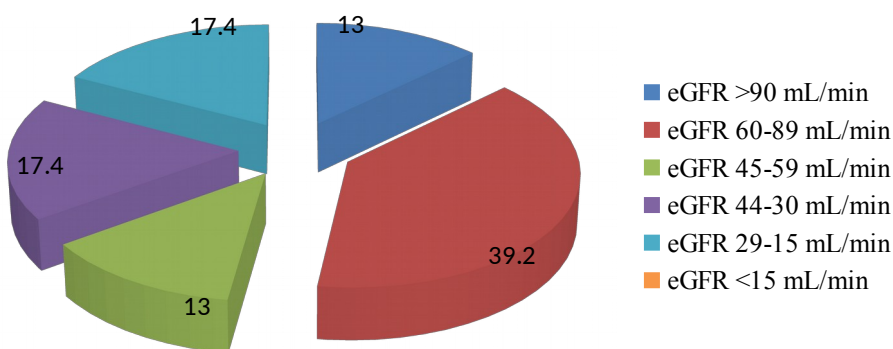
Стадирането на ХБЗ, според препоръките на KDIGO-2012г., се различават от тези, публикувани през 2002 г. от KDOQI и са както следва: (табл.4).

Табл. 3. Стадиране на ХБЗ според eGFR

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

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

В зависимостта от стойността на изчислената eGFR, проучваните пациенти със ЗД 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.11).



Фиг. 11. Разпределение на пациентите със ЗД според стойностите на eGFR

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

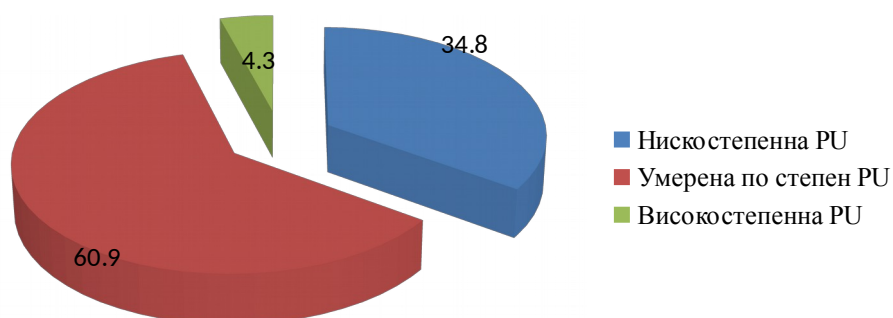
Степени на албуминурия при ХБЗ според K/DIGO-2012				
Албуминурия		Съотношение албумин/креатинин в урината		
Категория	(mg/24ч.)	ACR (mg/mmol)	PCR (mg/g)	
A1	под 30	под 3	под 30	нормално или леко повишена
A2	30-300	3-30	30-300	умерено повишена

A3	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.

В зависимостта от стойността на протеинурията проучваните пациенти със ЗД 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.12).



Фиг.12. *Разпределение на пациентите със ЗД според протеинурията*

2.4. Количествено определяне на нивото на продуктите на гликиране и антителата насочени 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. Конкурентна ELISA за количествено определяне на N-(ϵ)-CML и имидазолон

В PVC плаките за ELISA се накапват по 100 μ l/ямка AGE-BSA разреден в 50 mM карбонатен буфер (pH 9,6) до концентрация 10 μ g/ml (за анти-CML антитялото) или 1 μ g/ml (за анти-имидазолоновото антитяло) и се инкубира една нощ на 37°C. На следващия ден се правят две промивки с 200 μ l/ямка разтвор на 0,05 % Tween 20 в PBS и една промивка само с PBS. След това във всяка ямка се накапват 50 μ l стандарт (AGE-BSA в концентрация от 1 до 4000 μ g/ml) или аналитична проба (серум или урина) и 50 μ l 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. Конкурентната 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 μ l 50 mM цитратен буфер (pH 6), съдържащ 1 μ g/ml *o*-фенилендиамин (OPD) и 0,02% водороден пероксид. Реакцията се спира с по 100 μ l/ямка 0,8 M H₂SO₄. Измерва се абсорбцията при $\lambda=490$ nm. За обработка на данните се използва 4-параметрична (4P) логистична крива и концентрацията на N-(ϵ)-CML и имидазолон се изразява като микрограм-еквиваленти (μ g/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 μ l /ямка 10 μ 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 μ 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 μ l/ямка 0,05% Tween 20 в PBS и един път само с PBS. Серумите и урината се накапват по 100 μ l/ямка. Инкубира се 2 часа на 37°C, след което ямките се промиват, както по-горе. Накапват се по 100 мкл/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 µl 50 mM цитратен буфер (pH 6), съдържащ 1 мг/мл OPD и 0,02% водороден пероксид. Реакцията се спира с по 100 µl/ямка 0,8 M H₂SO₄. Измерва се абсорбцията при λ=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 µl от стандартни разтвори с известна концентрация на фруктозамини в границите от 0.06 mM до 8 mM и по 10 µl серум или урина. Към всяка ямка се добавят по 100 µl 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.

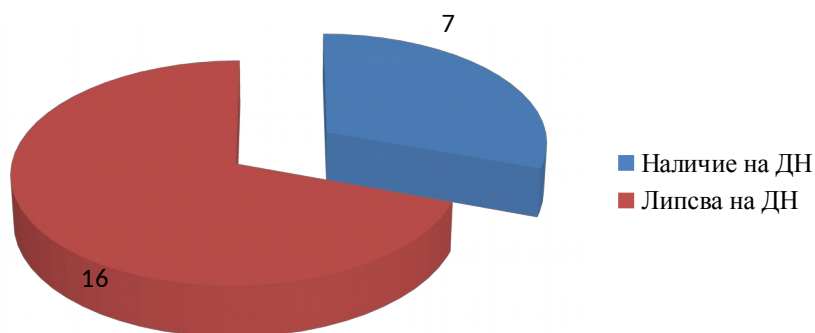
Определянето на нивата на продуктите на гликиране и антителата насочени срещу AGEs в плазмата от контролната група доброволни донори послужи за определяне на граничните стойности (cut-off), над които нивата определени при проучваните пациенти със ЗД, се приемат за повишени (положителни), а под които – 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 Амеракация асоциация за диабет – екскреция на патологично количество албумин с урината (alb>300 mg/24 h), наличие на офталмоскопски данни за диабетна ретинопатия, липса на клинични и лабораторни данни за друго заболяване на отделителната система.

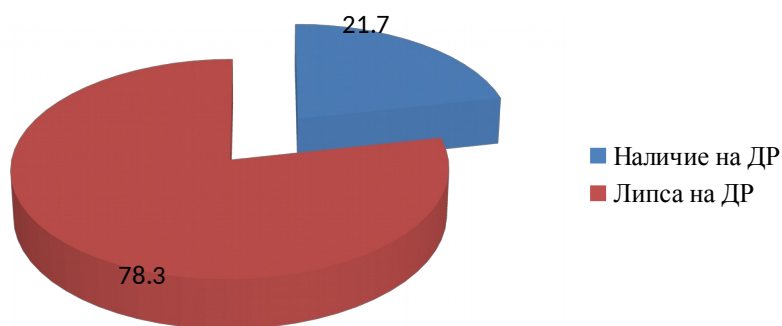
При 7 от проучваните пациенти (30,4%) е налице диабетна нефропатия, докато при 16 пациента (69,6%) липсва такава (фиг. 13).



Фиг. 13. *Разпределение на пациентите със ЗД според наличието и липсата на диабетна нефропатия*

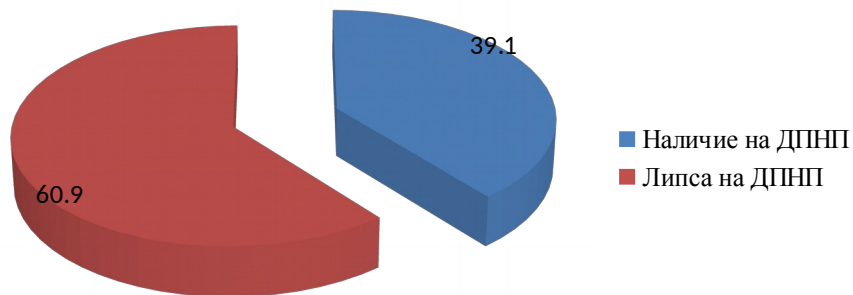
При всички пациенти със ЗД е провеждан скрининг за диабетна ретинопатия чрез провеждане на офталмоскопия. Диагностицирането на ДР се осъществява съгласно Международните клинични препоръки за ДР, издадени от Международната конференция по офталмология. Резултатите са определени като липса на очевидна ретинопатия, 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.14).



Фиг.14. *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.15).



Фиг.15. 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 клиничко-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[®], 2007 и GraphPad Prism[®], 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 χ^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

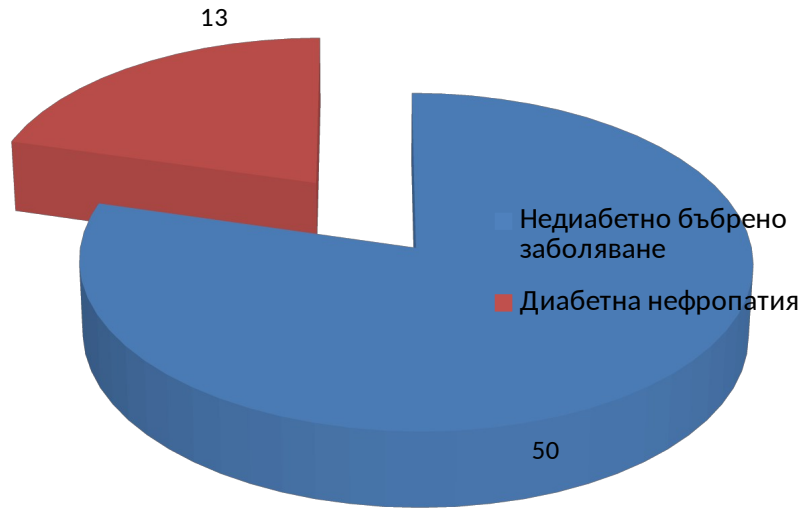
множествен сравнителен пост-тест на Bonferroni; корелационен анализ; линеен регресионен анализ; графично и таблично представяне на получените резултати.

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

V. Резултати:

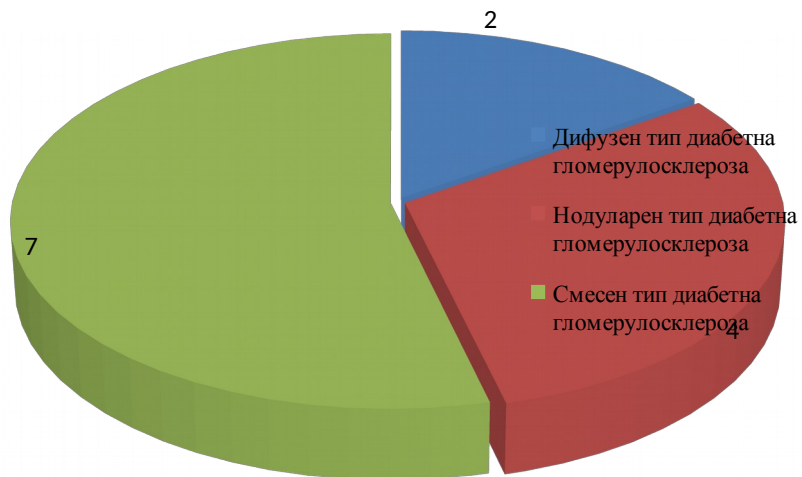
1. ДА СЕ ОПРЕДЕЛИ ЧЕСТОТА И ТИПЪТ МОРФОЛОГИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ, КОИТО СА ИМАЛИ ПОКАЗАНИЯ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА ПУНКЦИОННА БЪБРЕЧНА БИОПСИЯ.

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. 16).



Фиг. 16. *Разпределение на пациентите според наличието или липсата на диабетна ретинопатия*

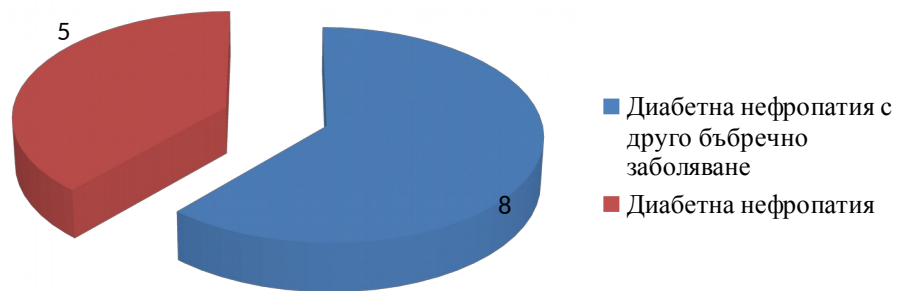
Сред пациентите с ДН се установява: дифузен тип диабетна гломерулосклероза – при 2 пациенти (15,4%); нодуларен тип диабетна гломерулосклероза – при 4 пациенти (30,8%) и смесен тип диабетна гломерулосклероза – при 7 пациенти (53,8%) (фиг.17).



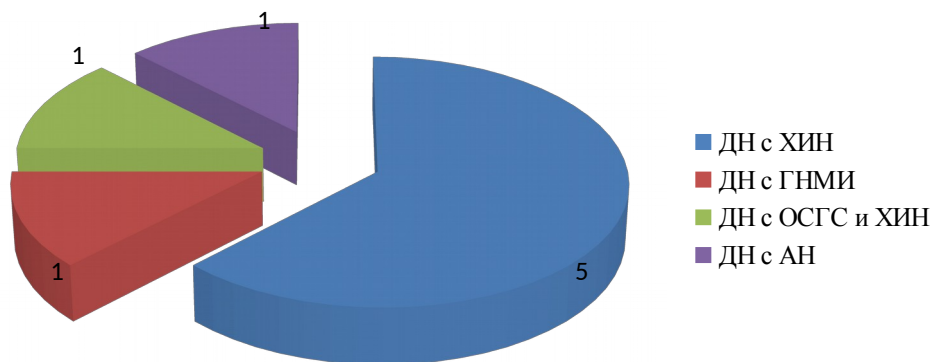
Фиг. 17. *Разпределение на пациентите според типа диабетна гломерулосклероза*

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.18,19).

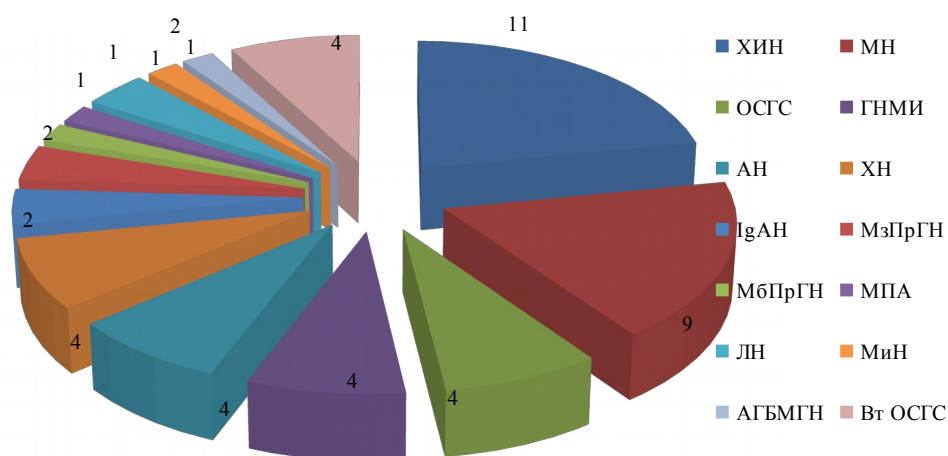


Фиг. 18. Разпределението на пациентите с ДН според наличието или липсата на друго бъбречно заболяване.



Фиг. 19. Разпределение на пациентите с ДН съчетана с друго бъбречно заболяване в зависимост от 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.20).



Фиг. 20. Разпределение на пациентите без ДН в зависимост от типа морфологични изменения

ИЗВОДИ:

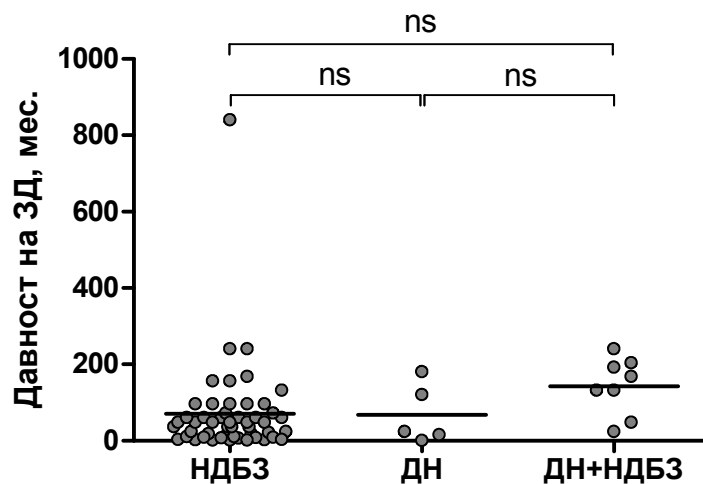
1. Морфологичните изменения при пациентите със захарен диабет, които са имали показание за провеждане на пункционна бъбречна биопсия са хетерогенни.
2. Висока е честота на недиабетното бъбречно заболяване при диабетичите.
3. Най-честото недиабетно бъбречно заболяване и интерстициалния нефрит.

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. Пациенти със ЗД и наличие само на ДН са 5 (100,0%) мъже. Пациенти 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 21, Таблица 5).



1

Фигура 21. 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 – незначителна 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.

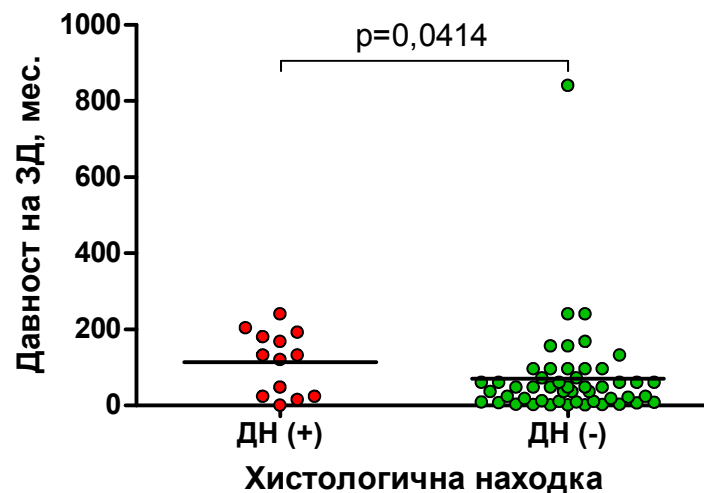
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	T	Significant? P <0,05?	95% CI of diff
НДБЗ с ДН	2,940	0,05332	Не	-132.9 to 138.7
НДБЗ с ДН+НДБЗ	-71,76	1,603	Не	-182.0 to 38.49
ДН с ДН+НДБЗ	-74,70	1,115	Не	-239.8 to 90.36

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 ≥ 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 22).



Фигура 22. 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

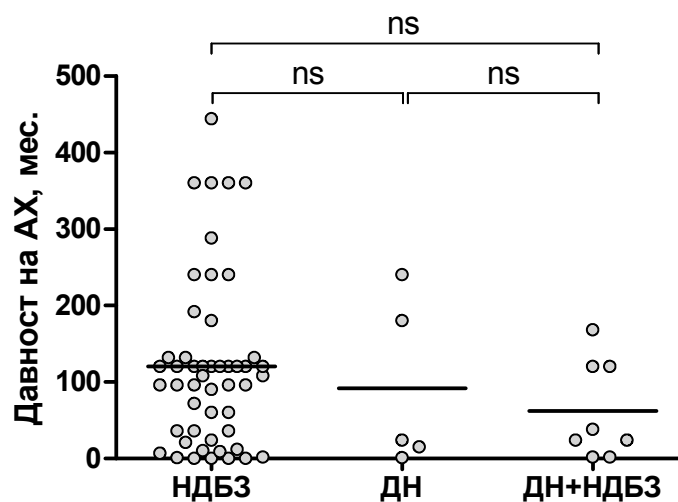
2.4. Диабетна полиневропатия.

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 23, Таблица 9).



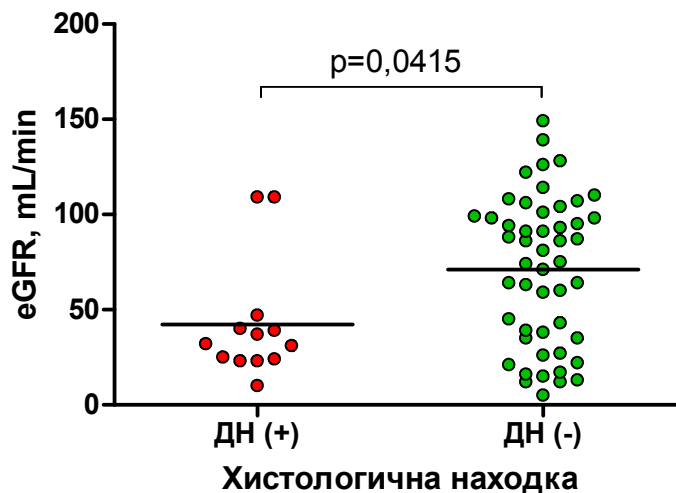
Фигура 23. Сравнителен анализ на давността на АХ при групите от пациентите с хистологични данни за НДБЗ, ДН и ДН с НДБЗ. Липсва значима разлика между средната давност на АХ между различните групи (One-way ANOVA, $p=0,3327$; Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns – несигнификантна разлика).

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	Не	-94.47 to 151.8
НДБЗ с ДН+НДБЗ	58,39	1,439	Не	-41.56 to 158.3
ДН с ДН+НДБЗ	29,75	0,4897	Не	-119.9 to 179.4

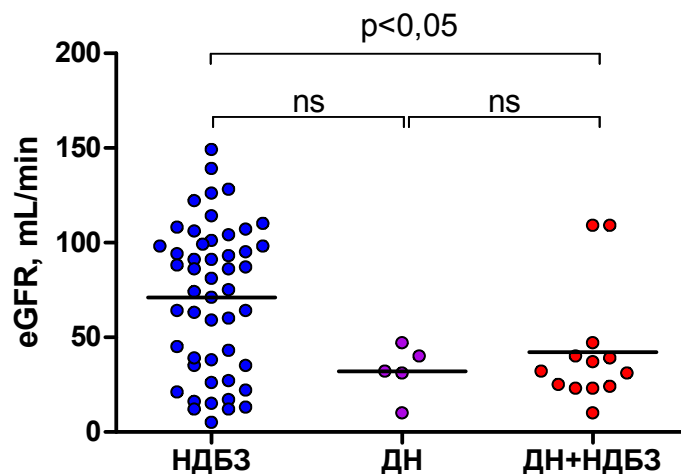
2.6. Скорост на гломерулна филтрация.

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 24).



Фигура 24. 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 25, Таблица 10).



Фигура 25. Сравнителен анализ на изчислената скорост на гломерулна филтрация при групите от пациентите с хистологични данни за HDZ, DN и DN с HDZ. Налице е значима разлика между средната скорост на гломерулна филтрация при пациентите с HDZ и тази при пациентите с DN+HDZ (One-way ANOVA, $p=0,0084$; Bonferroni's Multiple Comparison Test, ns – незначителна разлика).

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

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

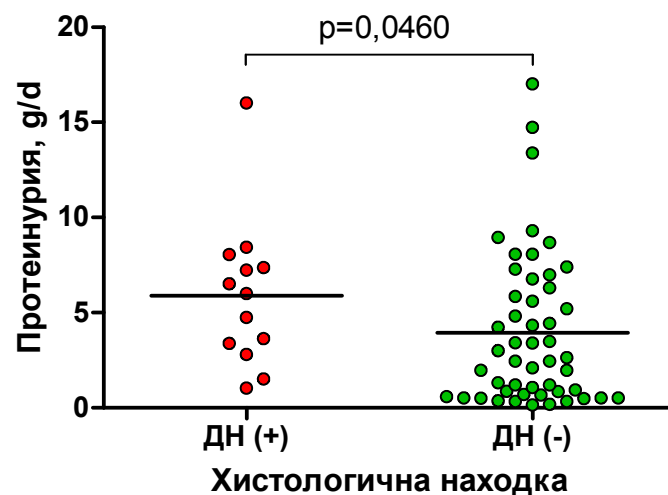
Не се установи статистически значима корелационна зависимост между давността на ЗД и eGFR при изследване на зависимостта сред всички пациенти със ЗД, включени в проучването (N=63) (Spearman, two-tailed, $r=-0,1724$, $p=0,1768$). Липса на статистически значима корелационна зависимост се потвърди и при изследване само на пациентите със ЗД с хистологични данни за HDZ без DN (Spearman, two-tailed, $r=-0,1317$, $p=0,3428$), при изследване на пациентите със ЗД с хистологични данни за DN без HDZ (Spearman, two-tailed, $r=0,600$, $p=0,3500$) и при изследване на пациентите със ЗД с хистологични данни за DN с HDZ (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, $r=0,1653$, $p=0,5894$).

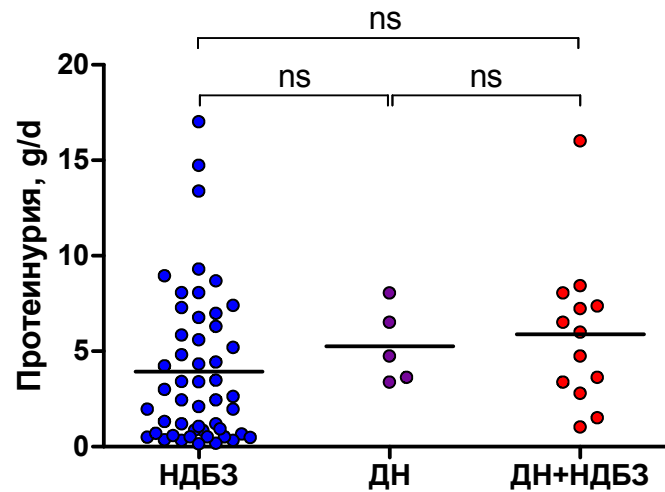
Сред всички изследвани пациенти със захарен диабет ($N=63$), при пациентите с хистологични данни за ДН средната протеинурия е $5,90\pm 3,90$ g/d, докато при пациентите със ЗД без хистологични данни за ДН средната протеинурия е $3,94\pm 3,99$ g/d. Налице е статистически значимо по-висока протеинурия при пациентите с хистологични данни за ДН (Mann-Whitney, two-tailed, $p=0,0460$, Фигура 26).



Фигура 26. 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 27, Таблица 11).



Фигура 27. 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.

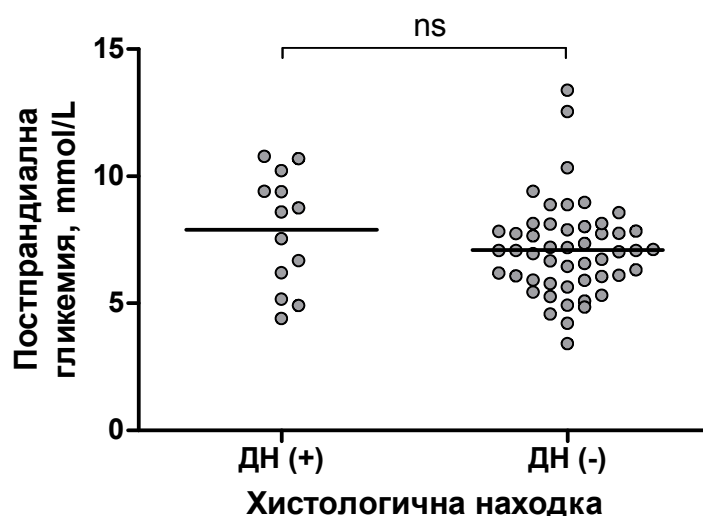
При изследване на уринния седимент при всички проучвани пациенти със ЗД (N=63) установихме, че наличието на патологично активен уринен седимент (над 5 еритроцита/ μL и/или над 5 левкоцита/ μL) не определя статистически значимо наличието на недиабетно бъбречно заболяване (Fisher's exact test, two-sided, $p=0,3603$). 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. Липсва 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, $p=0,9188$).

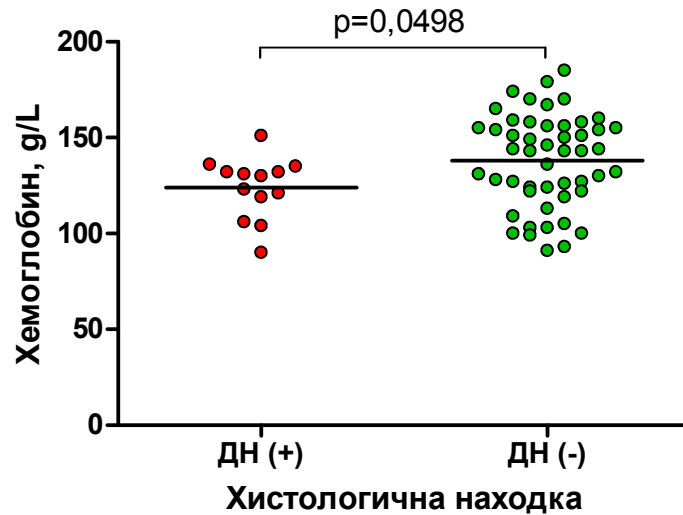
При изследване на постпрандиалната гликемия установихме същата липса на статистически значима разлика между средната кръвна концентрация на глюкоза 2 часа след нахранване при пациентите с хистологични данни за ДН ($7,89 \pm 2,24$ mmol/L) и тази при пациентите без хистологични данни за ДН ($7,10 \pm 1,85$ mmol/L) (Mann-Whitney test, two-tailed, $p=0,1909$, Фигура 28), въпреки че средната гликемия при пациентите с хистологично установена ДН е относително по-висока от тази при пациентите без хистологични данни за ДН.



Фигура 28. Сравнителен анализ на постпрандиалната гликемия при пациентите с и без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed, $p=0,1909$, ns – несигнификантна разлика).

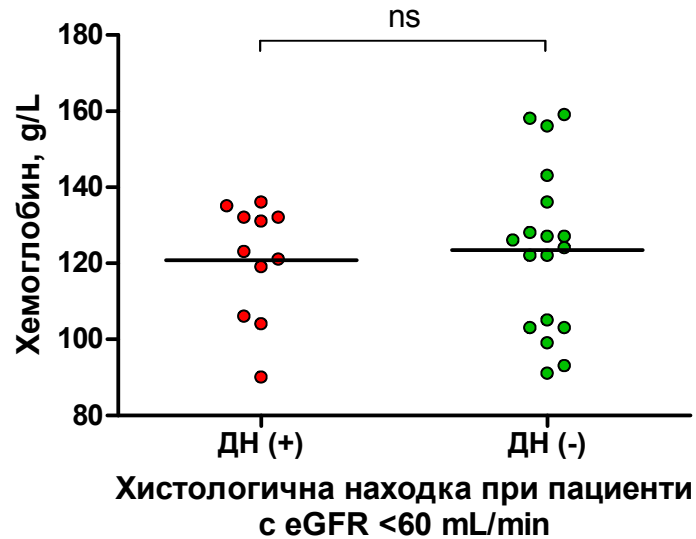
2.10. Нива на хемоглобина.

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 29).



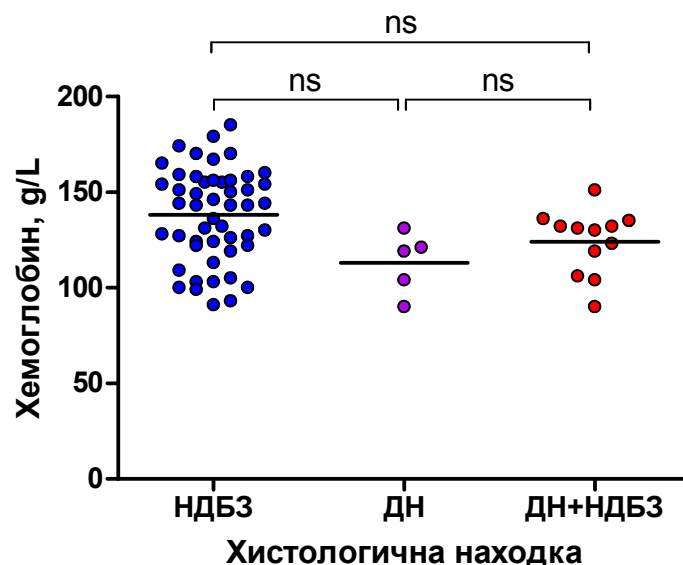
Фигура 29. Сравнителен анализ на нивата на хемоглобина (g/L) при пациентите с и без хистологични данни за ДН (Mann-Whitney test, two-tailed, $p=0,0498$).

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 30).



Фигура 30. 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 31, Таблица 12).



Фигура 31. 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 – незначителна 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	Ne	-1.038 to 51.16
НДБЗ с ДН+НДБЗ	13,98	1,921	Ne	-3.909 to 31.86
ДН с ДН+НДБЗ	-11,08	0,9200	Ne	-40.70 to 18.53

ИЗВОДИ:

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. Диабетната полиневропатия не е свързана с установяване на хистологични данни за диабетна нефропатия.

5. Наличието на хистологични данни за диабетна нефропатия при пациенти със захарен диабет е свързано с по-ниски стойности на изчислената скорост на гломерулна филтрация.

6. По-високите нива на протеинурията при пациентите със захарен диабет са свързани с наличие на хистологични признаци за диабетна нефропатия.

7. Нивата на хемоглобина са по-ниски при пациенти със захарен диабет и хистологични признаци на диабетна нефропатия в сравнение с нивата при пациентите със захарен диабет и липса на хистологични данни за диабетна нефропатия.

8. Гликемиите на гладно и постпрандиално не са свързани с наличие или липса на хистологични данни за диабетна нефропатия.

9. Уринният седимент не определя наличието или липсата на хистологични признаци за диабетна нефропатия.

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 $163,1257 \pm 138,1249$ μgEq-AGEs-BSA, въз основа на което определихме граничната стойност над която нивата на N(ε)-CML в урина, приехме за патологични:

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

В контролна група установихме нива на N(ε)-CML в 24-часова урина $120,8102 \pm 144,8811 \mu\text{Eq-AGEs-BSA}$, въз основа на което определихме граничната стойност над която нивата на N(ε)-CML в 24-ч.урина, приехме за патологични:

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

В контролна група установихме серумни нива на имидазолон $1913,251 \pm 640,9643 \mu\text{Eq-AGEs-BSA}$, 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 $0,092156 \pm 0,011954$ 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 $0,107426 \pm 0,043428$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (ОД 450 nm) на оптична плътност.

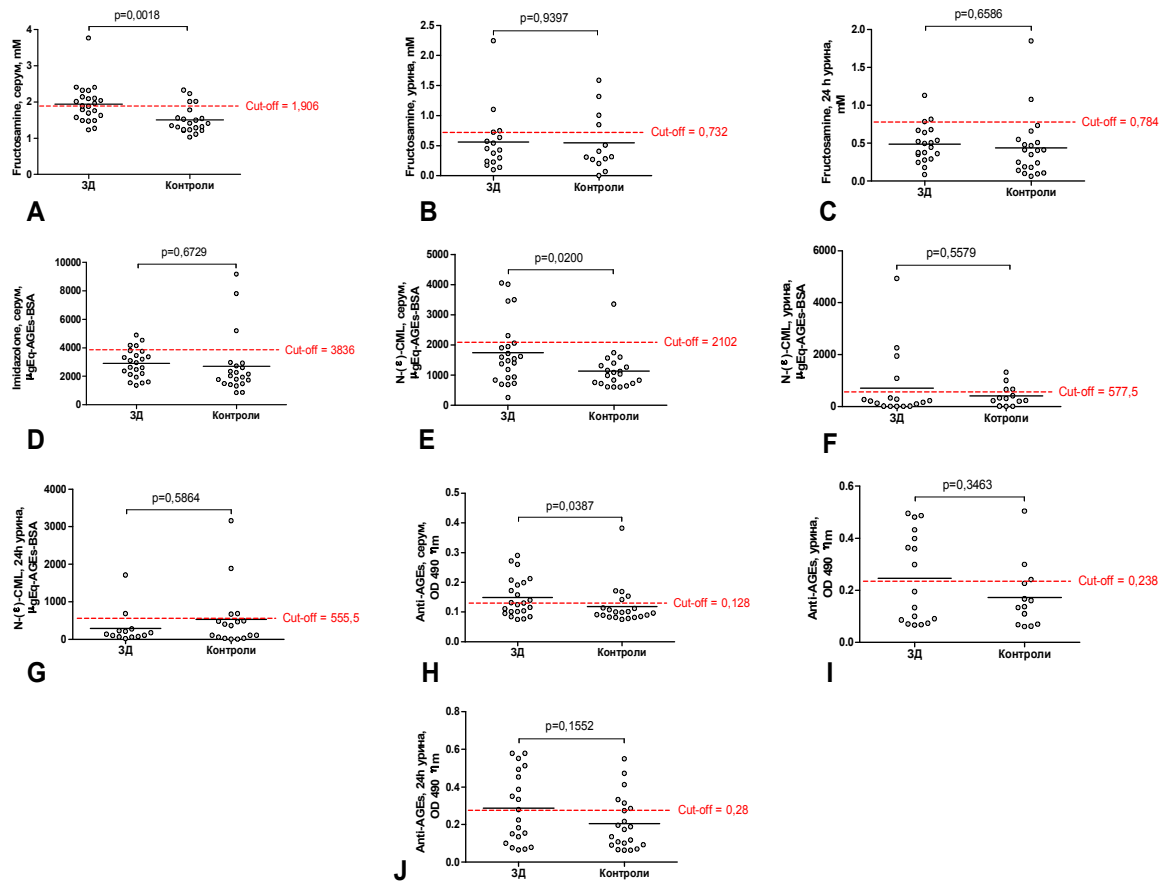
Въз основа на това определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-AGEs в урината при изследваните пациенти приехме за патологично повишени:

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

При изследване за Anti-AGEs в 24-часова урина при здрави доброволци се установиха нива на Anti-AGEs в 24-часова урина $0,119738 \pm 0,053273$ 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:

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



Фиг. 32. (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. 32-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. 32-B).

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 $0,44 \pm 0,41$ mM. Липсва статистически значима разлика между нивата при двете групи ($p=0,6586$) (Фиг. 32-C).

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 ± 1016 $\mu\text{Eq-AGEs-BSA}$, а в контролната група е 2695 ± 2147 $\mu\text{Eq-AGEs-BSA}$. Липсва статистическа значима разлика между серумните нива на имидазолон при двете групи ($p=0,6729$) (Фиг. 32-D).

3.5. N-(ϵ)-CML в серум:

При пациентите със захарен диабет средното ниво на N-(ϵ)-CML е 1743 ± 1073 $\mu\text{Eq-AGEs-BSA}$, а в контролната група е $1136 \pm 616,9$ $\mu\text{Eq-AGEs-BSA}$. При диабетици серумното ниво на N-(ϵ)-CML е значимо по-високо в сравнение с контролната група ($p=0,02$) (Фиг. 32-E).

3.6. N-(ϵ)-CML в прясна урина:

При пациентите със захарен диабет средното ниво на N-(ϵ)-CML в прясна урина е $700,8 \pm 1284$ $\mu\text{Eq-AGEs-BSA}$, а в контролната група е $410,7 \pm 398,9$ $\mu\text{Eq-AGEs-BSA}$. Не се установи статистически значима разлика между нивата на N-(ϵ)-CML в урината при двете групи ($p=0,5579$) (Фиг. 32-F).

3.7. N-(ϵ)-CML в 24-часова урина:

При пациентите със захарен диабет средното ниво на N-(ϵ)-CML в 24-часова урина е $295,7 \pm 458,4$ $\mu\text{Eq-AGEs-BSA}$, а в контролната група е $532,1 \pm 816,4$ $\mu\text{Eq-AGEs-BSA}$, като липсва статистически значима разлика между нивата при двете групи ($p=0,5864$) (Фиг. 32-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. 32-Н).

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. 32-И).

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.32-Ј).

Изводи:

1. Пациентите със захарен диабет имат значително по-високи серумни нива на фруктозамин в сравнение с контролите.
2. Пациентите със захарен диабет имат значително по-високи серумни нива на N-(ε)-CML в сравнение с контролите.
3. Няма значима разлика между серумните нива на имидазолон при диабетиците и контролите.
4. Пациентите със захарен диабет имат значително по-високи серумни нива на Anti-AGEs в сравнение с контролите.
5. Няма значима разлика между уринните нива на фруктозамин, N-(ε)-CML, имидазолон и Anti-AGEs при диабетиците и контролите.

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 връзка на нивата на продуктите на гликиране и anti-AGEs с възрастта на пациентите. Средната възраст на пациентите със ЗД е $60,26 \pm 10,14$ години.

4.1.1. Серумно ниво на фруктозамин и възраст на пациента:

При анализ на връзката на серумните нива на фруктозамин с възрастта на пациентите със ЗД установихме, че няма значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на фруктозамин в серума (Spearman, one-tailed, $r = -0,1428$, $p = 0,2579$). Такава корелационна зависимост не се установи нито при пациентите с ИНЗТ ЗД ($n = 17$) (Spearman, one-tailed, $r = 0,2647$, $p = 0,1111$), нито при пациентите с ИЗТ ЗД ($n = 6$) (Spearman, one-tailed, $r = -0,600$, $p = 0,1218$).

4.1.2. Серумно ниво на N-(ε)-CML и възраст на пациента :

При анализ на връзката на серумното ниво на N-(ε)-CML с възрастта на пациентите не се установи значима корелационна зависимост между тях (Spearman, one-tailed, $r = 0,2647$, $p = 0,1111$). Не се установи значима корелационна зависимост нито при пациентите с ИНЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r = 0,0683$, $p = 0,3763$), нито при пациентите с ИЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r = 0,1429$, $p = 0,4014$).

4.1.3. Нива на имидазолон в серума и възраст на пациента:

Няма значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на имидазолон в серума (Spearman, one-tailed, $r = -0,2027$, $p = 0,1768$). Не се установи такава корелационна зависимост нито при пациентите с ИНЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r = -0,1764$, $p = 0,2491$), нито при пациентите с ИЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r = -0,2000$, $p = 0,3569$).

4.1.4. Серумни нива на Anti-AGEs и възраст на пациента:

Няма значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на anti-AGEs в серума (Spearman, one-tailed, $r = 0,1115$, $p = 0,3062$). Такава

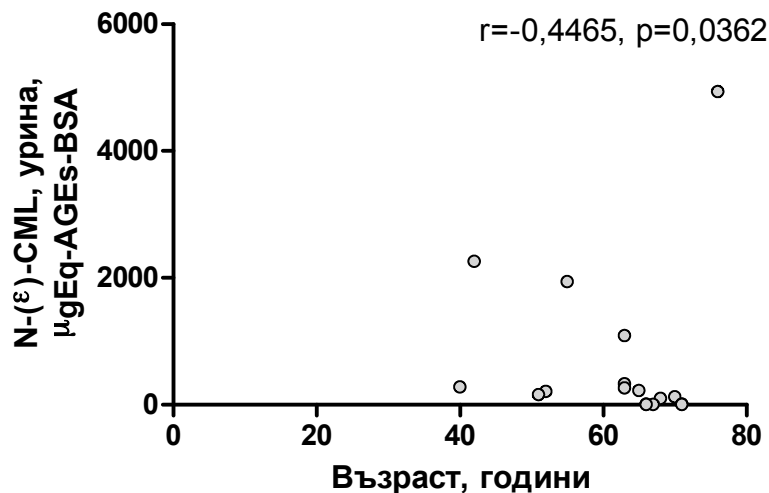
корелационна зависимост не се установи нито при пациентите с ИНЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,2147$, $p=0,2040$), нито при пациентите с ИЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,4857$, $p=0,1778$).

4.1.5. Фруктозамин в прясна урина и възраст на пациента:

Няма значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на фруктозамин в прясна урина (Spearman, one-tailed, $r=-0,3176$, $p=0,1153$).

4.1.6. Фруктозамин в 24 часова урина и възраст на пациента:

Няма значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на фруктозамин в 24-часова урина (Spearman, one-tailed, $r=0,1904$, $p=0,2107$).



Фигура 33. Анализ на връзката на нивата на N-(ε)-CML в прясна урина с давността за ЗД

4.1.7. N-(ε)-CML в прясна урина и възраст на пациента :

При анализ на нивата на N-(ε)-CML в прясна урината с възрастта на пациентите със ЗД установихме, че е налице значима обратна корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на N-(ε)-CML в прясна урина (Spearman, one-tailed, $r=-0,4465$, $p=0,0362$) (Фиг. 33)

4.1.8. N-(ε)-CML в 24-часова урина и възраст на пациента:

Няма значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на N-(ε)-CML в 24-часова урина (Spearman, one-tailed, $r=0,2711$, $p=0,3703$).

4.1.9. Anti-AGEs в прясна урина и възраст на пациента :

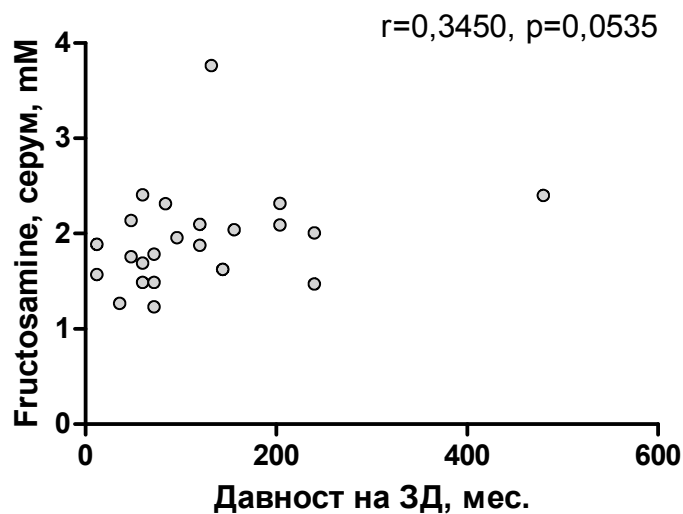
Няма значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на anti-AGEs в прясна урина (Spearman, one-tailed, $r=0,3210$, $p=0,1045$).

4.1.10. Anti-AGEs в 24-часова урина и възраст на пациента:

Не се установи значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите със ЗД и нивата на anti-AGEs в 24-часова урина (Spearman, one-tailed, $r=-0,0536$, $p=0,4112$).

4.2. Анализ на връзката на продуктите на неензимно гликиране и anti-AGEs с давността на ЗД

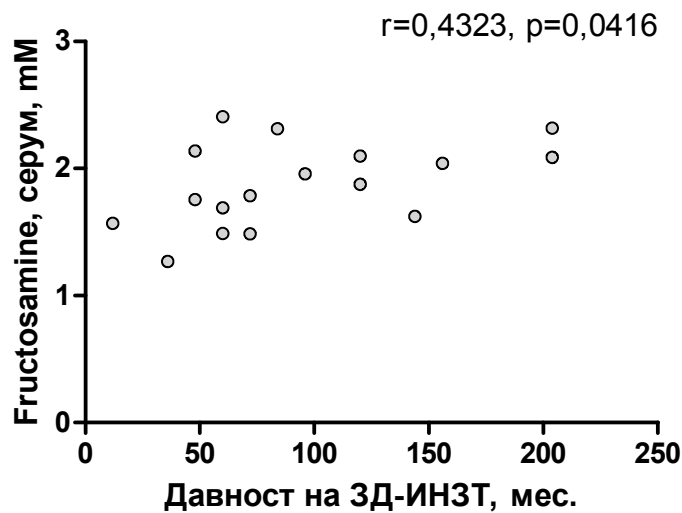
Средната продължителност на захарния диабет при всички 23 пациенти включени в проучването е $120,52 \pm 103,32$ месеца. При тези пациенти съпоставихме серумните и уринните нива на продуктите на гликиране и антителата насочени срещу AGEs с давността на диабета.



Фигура 34. Анализ на връзката на серумното ниво фруктозамин с давността на захарния диабет.

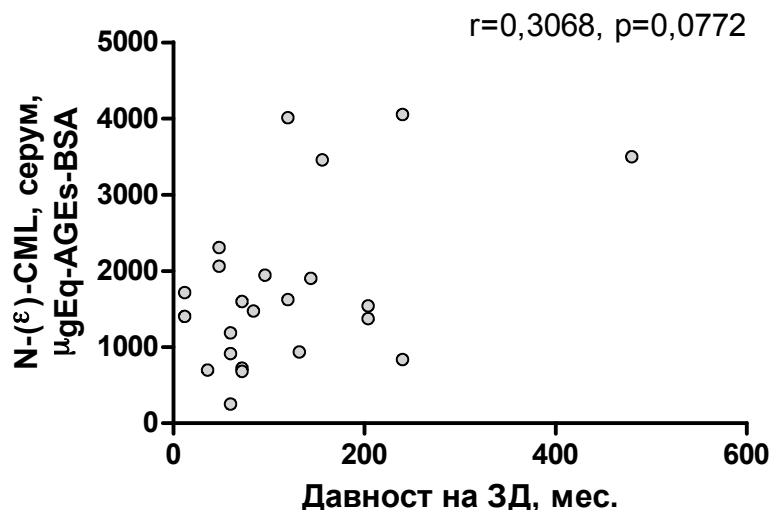
4.2.1. Фруктозамин в серум и давност на ЗД

При анализ на връзката на серумните нива на фруктозамин с давността на ЗД установихме, че при изследваните пациенти няма значима корелационна зависимост между давността на захарния диабет и нивата на фруктозамин в серума (Spearman, one-tailed, $r=0,3450$, $p=0,0535$) (Фиг. 34).



Фигура 35. 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. 35). Такава зависимост не се установи при пациентите с ИЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,3769$, $p=0,2486$).



Фигура 36. Анализ на връзката на серумното ниво на N-(ε)-CML с давността на захарния диабет.

4.2.2. N-(ε)-CML в серума и давност на ЗД

С нарастването на давността на захарния диабет нарастват и нивата на N-(ε)-CML в серума, но при изследваните пациенти няма значима корелационна зависимост между давността на захарния диабет и нивата на N-(ε)-CML в серума (Spearman, one-tailed, $r=0,3068$, $p=0,0772$) (фиг. 36). Няма значима такава корелационна зависимост при пациентите с ИНЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,3313$, $p=0,0970$), както няма и при пациентите с ИЗТ ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,4348$, $p=0,2097$).

4.2.3. Имидазолон в серум и давност на ЗД

При изследваните пациенти не установихме значима корелационна зависимост между давността на ЗД и нивата на имидазолон в серума (Spearman, one-tailed, $r=0,0783$, $p=0,3612$).

4.2.4. Anti-AGEs в серум и давност на ЗД

При изследваните пациенти няма значима корелационна зависимост между давността на ЗД и нивата на anti-AGEs в серума (Spearman, one-tailed, $r=0,1542$, $p=0,2413$).

4.2.5. Фруктозамин в прясна урина и давност на ЗД

Няма значима корелационна зависимост между давността на ЗД и нивата на фруктозамин в прясна урина (Spearman, one-tailed, $r=0,0533$, $p=0,4223$).

4.2.6. Фруктозамин в 24 часова урина и давност на ЗД

При изследваните пациенти не се установи значима корелационна зависимост между давността на ЗД и нивата на фруктозамин в 24-часова урина (Spearman, one-tailed, $r=0,1674$, $p=0,2402$).

4.2.7. N-(ε)-CML в прясна урина и давност на ЗД

Не се установи значима корелационна зависимост между давността на ЗД и нивата на N-(ε)-CML в прясна урина (Spearman, one-tailed, $r=0,2280$, $p=0,1894$).

4.2.8. N-(ε)-CML в 24-часова урина и давност на ЗД

При изследваните пациенти не се установи значима корелационна зависимост между давността на ЗД и нивата на N-(ε)-CML в 24-часова урина (Spearman, one-tailed, $r=0,0277$, $p=0,4642$).

4.2.9. Anti-AGEs в прясна урина

Няма значима корелационна зависимост между давността на ЗД и нивата на anti-AGEs в прясна урина (Spearman, one-tailed, $r=0,3389$, $p=0,0917$).

4.2.10. Anti-AGEs в 24-часова урина

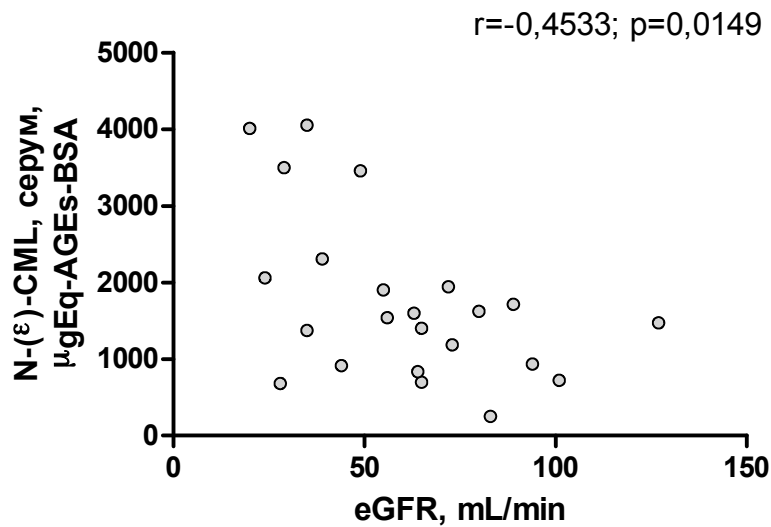
Няма значима корелационна зависимост между давността на ЗД и нивата на anti-AGEs в 24-часова урина (Spearman, one-tailed, $r=-0,2418$, $p=0,1522$).

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

4.3.1. Фруктозамин в серум и eGFR

При изследваните пациенти със захарен диабет не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в серума и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти (Spearman, one-tailed, $r=-0,1018$, $p=0,3219$). Средното ниво на фруктозамин в серума при изследваните пациенти ($n=23$) с намалена скорост на eGFR под 60 mL/min е

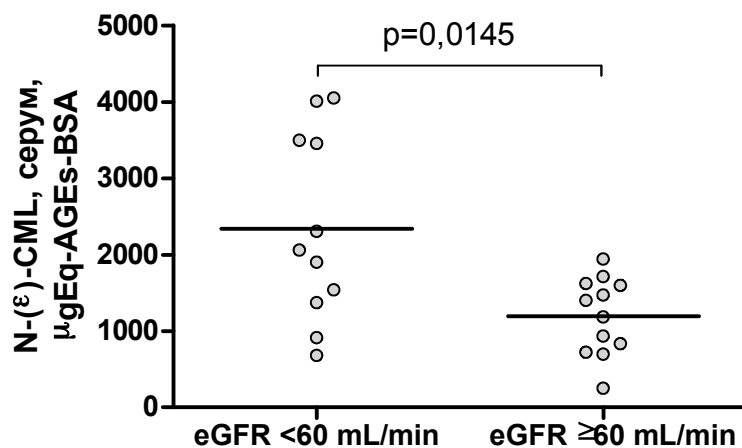
1,988±0,355 mM, докато това при пациентите със скорост на eGFR ≥ 60 mL/min е 1,896±0,659 mM, като няма статистически значима разлика между тях (Mann-Whitney test, one-tailed, p=0,0929).



Фигура 37. Анализ на връзка на серумните нива на N-(ε)-CML с eGFR при пациентите със захарен диабет

4.3.2. N-(ε)-CML в серума и eGFR

Налице е статистически значима отрицателна корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в серума и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти (n=23) (Spearman, one-tailed, r=-0,4533, p=0,0149) (фиг. 37).



Фигура 38. Сравнителен анализ на серумното ниво на N-(ε)-CML при диабетници с eGFR < 60 mL/min и eGFR ≥ 60 mL/min

Средното ниво на N-(ε)-CML в серума при изследваните пациенти (n=23) с намалена скорост на eGFR под 60 mL/min е 2341,0±1221,0 μgEq-AGEs-BSA, докато това при пациентите със скорост на eGFR ≥60 mL/min е 1194,0±509,4 μgEq-AGEs-BSA, като е налице статистически значима разлика между тях (Mann-Whitney test, one-tailed, p=0,0145) (Фиг. 38).

Сред пациентите с патологично повишени нива на N-(ε)-CML в серума (n=5), тези с eGFR <60 mL/min са 5 (100%), докато сред пациентите с референтни нива на N-(ε)-CML в серума (n=18), тези с eGFR <60 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 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.

4.3.3. Имидазолон в серум и eGFR

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на имидазолон в серума и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти (n=23) (Spearman, one-tailed, r=0,1859, p=0,1979).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на имидазолон в серума и концентрацията на креатинина в серума при изследваните пациенти (n=23) (Spearman, one-tailed, r=-0,06377, p=0,3863).

Средното ниво на имидазолон в серума при изследваните пациенти (n=23) с намалена скорост на eGFR под 60 mL/min е 2832,0±1119,0 μgEq-AGEs-BSA, докато това при пациентите със скорост на eGFR ≥60 mL/min е 2976,0±956,1 μgEq-AGEs-BSA, като няма статистически значима разлика между тях (Mann-Whitney test, one-tailed, p=0,3929).

Сред пациентите с патологично повишени нива на имидазолон в серума (n=4), тези с eGFR <60 mL/min са 2 (50%), докато сред пациентите с референтни нива на имидазолон в серума (n=19), тези с eGFR <60 mL/min са 10 (52,6%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на имидазолон в серума не определя статистически значимо наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) при пациентите със ЗД (Fisher's exact test, one-sided, p=0,6708).

4.3.4. Anti-AGEs в серум и eGFR

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в серума и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти със ЗД (n=23) (Spearman, one-tailed, $r=-0,1364$, $p=0,2674$).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в серума и концентрацията на креатинина в серума при изследваните пациенти със ЗД (n=23) (Spearman, one-tailed, $r=0,2130$, $p=0,1645$).

Средното ниво на anti-AGEs в серума при изследваните пациенти (n=23) с намалена изчислена скорост на eGFR под 60 mL/min е $0,1618,0 \pm 0,0670$ OD 490 nm, сравнително по-високо от това при пациентите със скорост на eGFR ≥ 60 mL/min, което е $0,1349 \pm 0,0622$ OD 490 nm, като няма статистически значима разлика между тях (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,1150$).

Сред пациентите с патологично повишени нива на anti-AGEs в серума (n=12), тези с eGFR <60 mL/min са 7 (58,3%), докато сред пациентите с референтни нива на anti-AGEs в серума (n=11), тези с eGFR <60 mL/min са 5 (45,5%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на anti-AGEs в серума не определя статистически значимо наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) при изследваните пациенти със ЗД (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,4211$).

4.3.5. Фруктозамин в прясна урина и eGFR

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в прясна урина и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти със ЗД (n=16) (Spearman, one-tailed, $r=0,2618$, $p=0,1637$).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в прясна урина и концентрацията на креатинина в серума при изследваните пациенти със ЗД (n=16) (Spearman, one-tailed, $r=-0,1751$, $p=0,2583$).

Средното ниво на фруктозамин в прясна урина при изследваните пациенти със ЗД (n=16) с намалена скорост на eGFR под 60 mL/min е $0,4338 \pm 0,1523$ mM, сравнително по-ниско от това при пациентите със скорост на eGFR ≥ 60 mL/min, което е $0,6894 \pm 0,7225$ mM, като няма статистически значима разлика между двете нива (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,4392$).

Сред пациентите с патологично повишени нива на фруктозамин в прясна урина (n=3) тези с намалена eGFR под 60 mL/min са 0 (0%), докато сред пациентите с

референтни нива на фруктозамин в прясна урина (n=13), тези с намалена eGFR под 60 mL/min са 8 (61,5%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на фруктозамин в прясна урина не определя статистически значимо наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) при изследваните пациенти със ЗД (Fisher's exact test, one-sided, p=0,1000).

4.3.6. Фруктозамин в 24-часова урина и eGFR

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в 24-часова урина и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти със ЗД (n=20) (Spearman, one-tailed, r=0,2763, p=0,1192).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в 24-часова урина и концентрацията на креатинина в серума при изследваните пациенти със ЗД (n=20) (Spearman, one-tailed, r=-0,3401, p=0,0712).

Средното ниво на фруктозамин в 24-часова урина при изследваните пациенти със ЗД (n=20) с намалена скорост на eGFR под 60 mL/min е $0,4544 \pm 0,1681$ mM, сравнително по-ниско от това при пациентите със скорост на eGFR ≥ 60 mL/min, което е $0,5184 \pm 0,3145$ mM, като няма статистически значима разлика между двете нива (Mann-Whitney test, one-tailed, p=0,3668).

Сред пациентите с патологично повишени нива на фруктозамин в 24-часова урина (n=2) няма такива с намалена eGFR под 60 mL/min (0%), докато сред пациентите с референтни нива на фруктозамин в 24-часова урина (n=18), тези с намалена eGFR под 60 mL/min са 10 (55,6%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на фруктозамин в 24-часова урина не определя статистически значимо наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) при изследваните пациенти със ЗД (Fisher's exact test, one-sided, p=0,2368).

4.3.7. N-(ε)-CML в прясна урина и eGFR

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в прясна урина и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти със ЗД (n=17) (Spearman, one-tailed, r=-0,0564, p=0,4149).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в прясна урина и концентрацията на серумния креатинин при изследваните пациенти със ЗД (n=17) (Spearman, one-tailed, r=0,1422, p=0,2930).

Средното ниво на N-(ε)-CML в прясна урина при изследваните пациенти със ЗД (n=17) с намалена скорост на eGFR под 60 mL/min е 789,8±1587 μgEq-AGEs-BSA, сравнително по-високо от това при пациентите със скорост на eGFR ≥60 mL/min, което е 600,6±932,6 μgEq-AGEs-BSA, като няма статистически значима разлика между двете нива (Mann-Whitney test, one-tailed, p=0,3365).

Сред пациентите с патологично повишени нива на N-(ε)-CML в прясна урина (n=4) тези с намалена eGFR под 60 mL/min са 2 (50%), докато сред пациентите с референтни нива на N-(ε)-CML в прясна урина (n=13), тези с намалена eGFR под 60 mL/min са 7 (53,8%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в прясна урина не определя статистически значимо наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) при изследваните пациенти със ЗД (Fisher's exact test, one-sided, p=0,6647).

4.3.8. N-(ε)-CML в 24-часова урина и eGFR

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в 24-часова урина и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти със ЗД (n=13) (Spearman, one-tailed, r=0,3791, p=0,1007).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в 24-часова урина и концентрацията на серумния креатинин при изследваните пациенти със ЗД (n=13) (Spearman, one-tailed, r=-0,2747, p=0,1818).

Средното ниво на N-(ε)-CML в 24-часова урина при изследваните пациенти със ЗД (n=13) с намалена скорост на eGFR под 60 mL/min е 122,2±99,68 μgEq-AGEs-BSA, сравнително по-ниско от това при пациентите със скорост на eGFR ≥60 mL/min, което е 444,4±596,7 μgEq-AGEs-BSA, като няма статистически значима разлика между двете нива (Mann-Whitney test, one-tailed, p=0,0688).

Сред пациентите с патологично повишени нива на N-(ε)-CML в 24-часова урина (n=2) няма такива с намалена eGFR под 60 mL/min са (0%), докато сред пациентите с референтни нива на N-(ε)-CML в 24-часова урина (n=11), тези с намалена eGFR под 60 mL/min са 6 (54,5%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в 24-часова урина не определя статистически значимо наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) при изследваните пациенти със ЗД (Fisher's exact test, one-sided, p=0,2692).

4.3.9. Anti-AGEs в прясна урина и eGFR

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в прясна урина и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти със ЗД (n=17) (Spearman, one-tailed, $r=-0,1974$, $p=0,2238$).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в прясна урина и концентрацията на серумния креатинин при изследваните пациенти със ЗД (n=17) (Spearman, one-tailed, $r=0,1349$, $p=0,3029$).

Средното ниво на anti-AGEs в прясна урина при изследваните пациенти със ЗД (n=17) с намалена изчислена скорост на eGFR под 60 mL/min е $0,2855,0 \pm 0,1931$ OD 490 nm, сравнително по-високо от това при пациентите с изчислена скорост на eGFR ≥ 60 mL/min, което е $0,2025 \pm 0,1438$ OD 490 nm, като няма статистически значима разлика между тях (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,2707$).

Сред пациентите с патологично повишени нива на anti-AGEs в прясна урина (n=8), тези с eGFR <60 mL/min са 5 (62,5%), докато сред пациентите с референтни нива на anti-AGEs в прясна урина (n=9), тези с eGFR <60 mL/min са 4 (44,4%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на anti-AGEs в прясна урина не определя статистически значимо наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) при изследваните пациенти със ЗД (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,3992$).

4.3.10. Anti-AGEs в 24-часова урина и eGFR

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в 24-часова урина и изчислената скорост на гломерулна филтрация при изследваните пациенти със ЗД (n=20) (Spearman, one-tailed, $r=0,0752$, $p=0,3763$).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в 24-часова урина и концентрацията на серумния креатинин при изследваните пациенти със ЗД (n=20) (Spearman, one-tailed, $r=0,0331$, $p=0,4449$).

Средното ниво на anti-AGEs в 24-часова урина при изследваните пациенти (n=20) със ЗД с намалена изчислена скорост на ГФ под 60 mL/min е $0,2790,0 \pm 0,2176$ OD 490 nm, сравнително по-ниско от това при пациентите с изчислена скорост на ГФ ≥ 60 mL/min, което е $0,2955 \pm 0,1646$ OD 490 nm, като няма статистически значима разлика между тях (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,3980$).

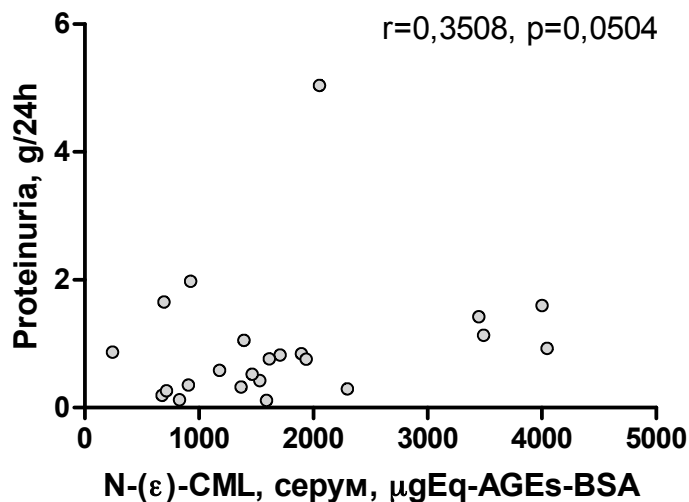
Сред пациентите с патологично повишени нива на anti-AGEs в 24-часова урина (n=9), тези с eGFR <60 mL/min са 4 (44,4%), докато сред пациентите с референтни нива

на anti-AGEs в 24-часова урина (n=11), тези с eGFR <60 mL/min са 6 (54,5%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на anti-AGEs в 24-часова урина не определя статистически значимо наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR <60 mL/min) при изследваните пациенти със ЗД (Fisher's exact test, one-sided, p=0,5000).

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

4.4.1. Фруктозамин в серум и протеинурия

При изследване на пациенти със ЗД не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в серума и протеинурията (Spearman, one-tailed, $r=0,2648$, $p=0,1110$).



Фигура 39. Анализ на връзката на серумните нива на N-(ε)-CML с протеинурията при пациенти със захарен диабет

4.4.2. N-(ε)-CML в серум и протеинурия

При изследваните пациенти със захарен диабет не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в серума и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД (n=23) (Spearman, one-tailed, $r=0,3508$, $p=0,0504$) (Фиг. 39).

4.4.3. Имидазолон в серум и протеинурия

При изследваните пациенти със ЗД не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на имидазолон в серума и протеинурията. (n=23) (Spearman, one-tailed, $r=0,2401$, $p=0,1349$).

4.4.4. Anti-AGEs в серума и протеинурия

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в серума и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД (n=23) (Spearman, one-tailed, $r=-0,0949$, $p=0,3334$).

4.4.5. Фруктозамин в прясна урина и протеинурия

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в прясна урина и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД (n=16) (Spearman, one-tailed, $r=-0,1882$, $p=0,2425$).

4.4.6. Фруктозамин в 24-часова урина и протеинурия

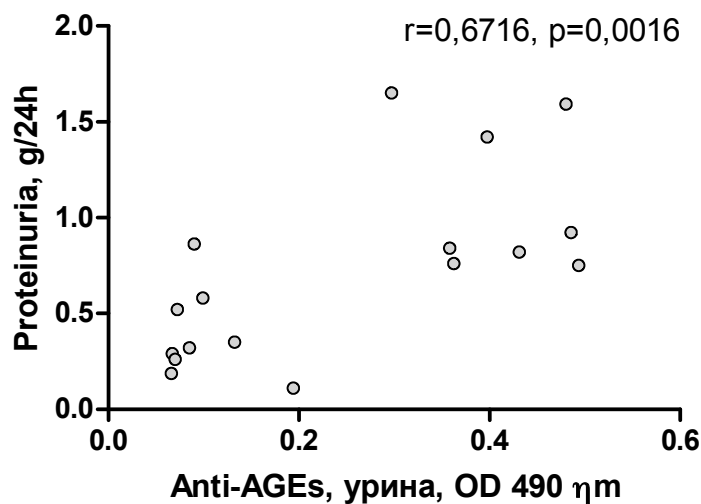
Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в 24-часова урина и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД (n=20) (Spearman, one-tailed, $r=0,0354$, $p=0,4412$).

4.4.7. N-(ε)-CML в прясна урина и протеинурия

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в прясна урина и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД (n=17) (Spearman, one-tailed, $r=0,1544$, $p=0,2770$).

4.4.8. N-(ε)-CML в 24-часова урина и протеинурия

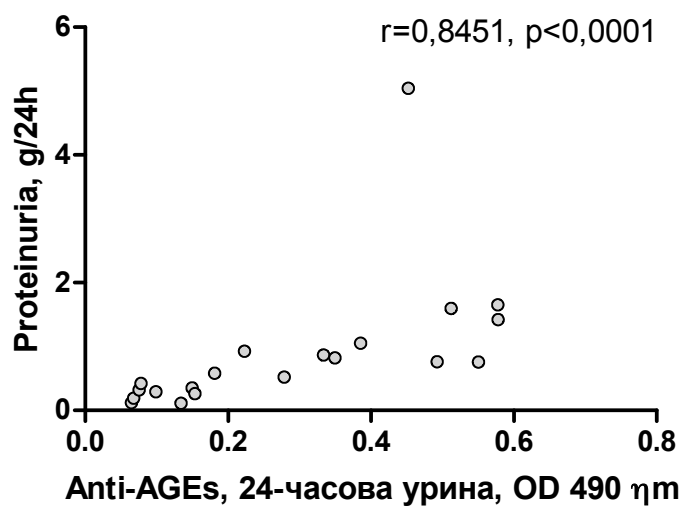
Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на N-(ε)-CML в 24-часова урина и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД (n=13) (Spearman, one-tailed, $r=0,2033$, $p=0,2527$).



Фигура 40. Анализ на зависимостта на нивото на anti-AGEs в прясна урина и протеинурията при пациентите със ЗД

4.4.9. Anti-AGEs в прясна урина и протеинурията

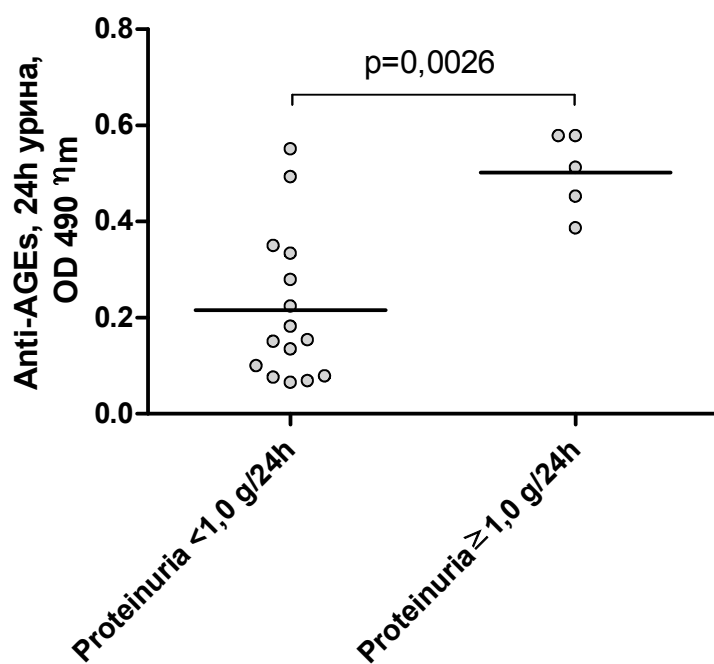
Налице е статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на anti-AGEs в прясна урина и протеинурията при изследваните пациенти със ЗД ($n=17$) (Spearman, one-tailed, $r=0,6716$, $p=0,0016$) (Фиг. 40).



Фигура 41. Анализ на зависимостта на нивото на anti-AGEs в прясна урина и протеинурията при пациентите със ЗД

4.4.10. Anti-AGEs в 24-часова урина и протеинурията

Налице е 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. 41).

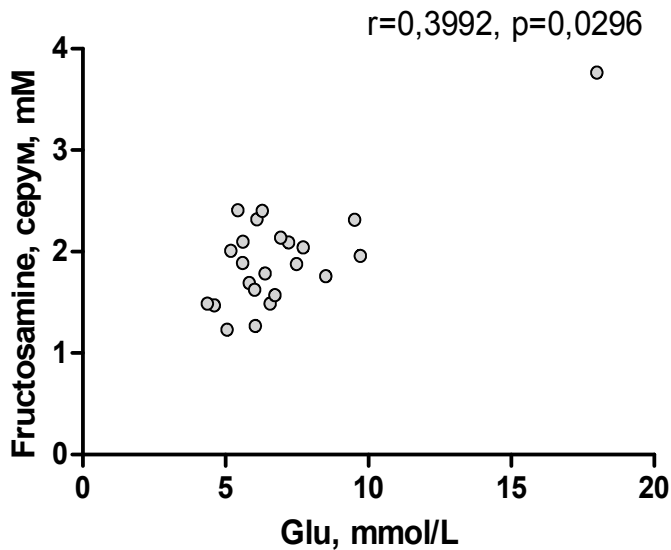


Фигура 42. Сравнителен анализ на нивата на Anti-AGEs в 24-часова урина при пациенти с протеинурия < 1,0 g/24h и протеинурия ≥1,0 g/24h

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. 42).

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

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

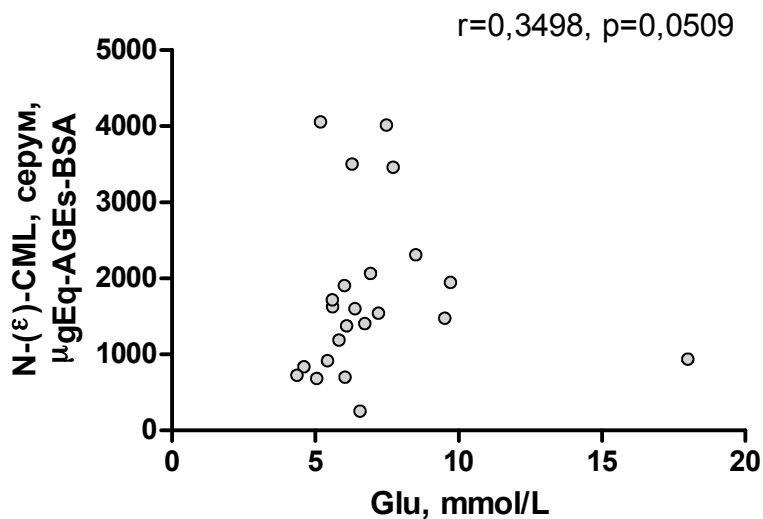


Фигура 43. Анализ на връзката на серумните нива на фруктозамин и гликемията на гладно при пациенти със захарен диабет

4.5.1. Фруктозамин в серум и гликемия

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. 43).

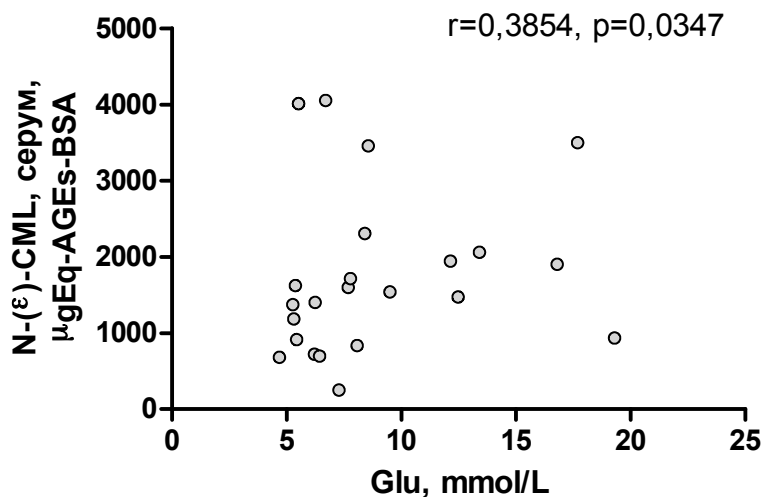
Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на фруктозамин в серума и постпрандиалната гликемия при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,3399$, $p=0,0563$).



Фигура 44. Анализ на връзката на серумните нива на N-(ε)-CML и гликемията на гладно при пациенти със захарен диабет

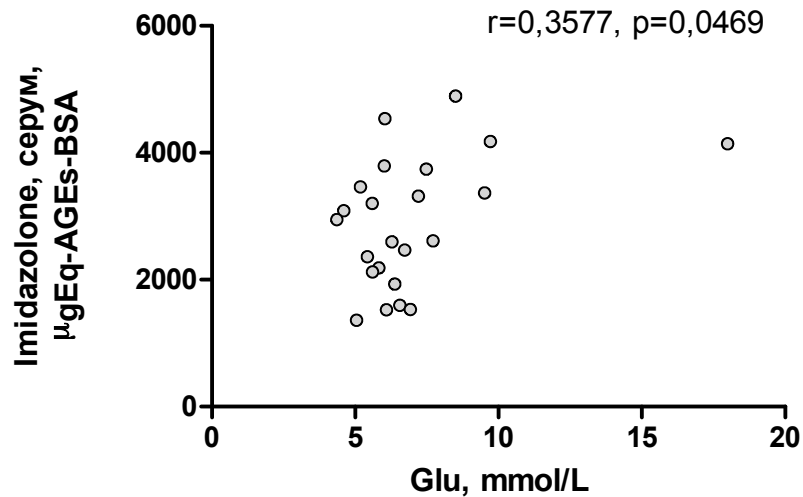
4.5.2. N-(ε)-CML в серум и гликемия

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.44).



Фигура 45. Анализ на връзката на серумните нива на N-(ε)-CML и постпрандиалната гликемия на при пациенти със захарен диабет

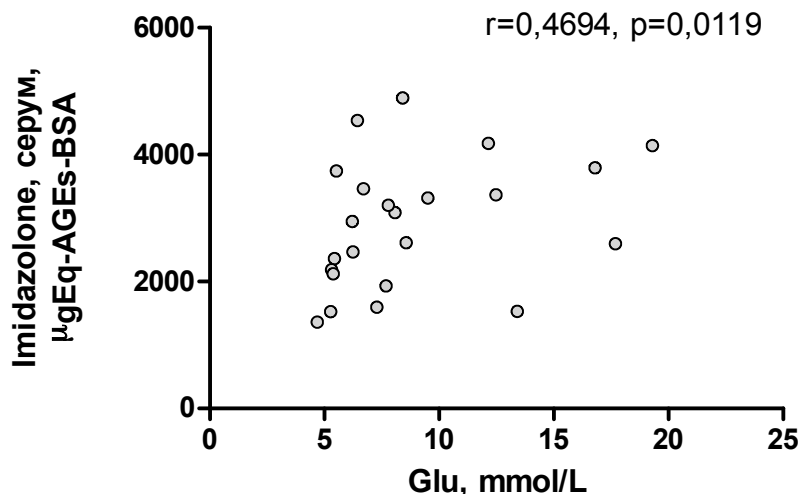
Налице е статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и нивата на N-(ε)-CML в серума при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,3854$, $p=0,0347$) (Фиг. 45)



Фигура 46. Анализ на връзката на серумните нива на N-(ε)-CML и гликемията на гладно при пациенти със захарен диабет

4.5.3. Имидазолон в серум и гликемия

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. 46).



Фигура 47. Анализ на връзката на серумните нива на *N*-(ε)-CML 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. 47)

4.5.4. Anti-AGEs в серум и гликемия

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на гликемията на гладно и серумните нива на anti-AGEs при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,2678$, $p=0,1083$).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и серумните нива на anti-AGEs при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=-0,0613$, $p=0,3906$).

4.5.5. Фруктозамин в прясна урина и гликемия

Не се установи корелационна зависимост между нивата на гликемията на гладно и нивата на фруктозамин в прясна урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,1118$, $p=0,3401$).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и нивата на фруктозамин в прясна урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=-0,0235$, $p=0,4655$).

4.5.5. Фруктозамин в 24-часова урина и гликемия

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на гликемията нагладно и нивата на фруктозамин в 24-часова урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,1143$, $p=0,3156$).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и нивата на фруктозамин в 24-часова урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,2873$, $p=0,1097$).

4.5.6. N-(ε)-CML в прясна урина и гликемия

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на гликемията нагладно и нивата на N-(ε)-CML в прясна урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=-0,0784$, $p=0,3824$).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и нивата на N-(ε)-CML в прясна урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=-0,0882$, $p=0,3682$).

4.5.7. N-(ε)-CML в 24-часова урина и гликемия

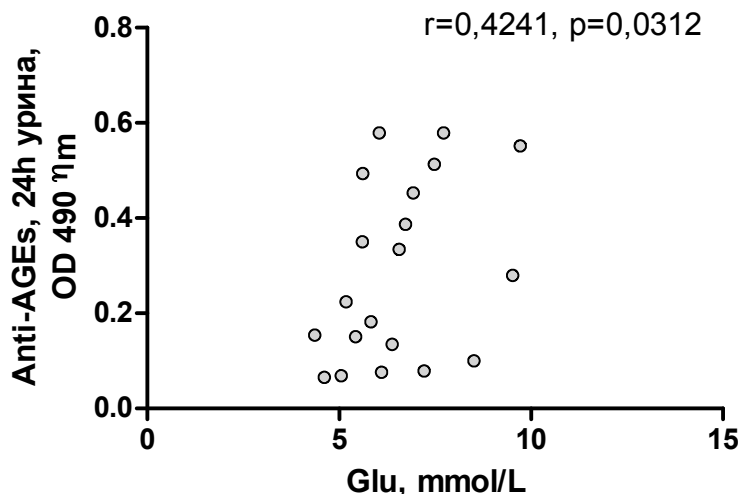
Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на гликемията нагладно и нивата на N-(ε)-CML в 24-часова урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=-0,1209$, $p=0,3470$).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и нивата на N-(ε)-CML в 24-часова урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=-0,1154$, $p=0,3537$).

4.5.9. Anti-AGEs в прясна урина и гликемия

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на гликемията нагладно и нивата на anti-AGEs в прясна урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,1422$, $p=0,2931$).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и нивата на anti-AGEs в прясна урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,2917$, $p=0,1280$).



Фигура 48. Анализ на връзката на нивата на Anti-AGEs в 24-часова урина и гликемията на гладно при пациенти със захарен диабет

4.5.10. Anti-AGEs в 24-часова урина и гликемия

Налице е статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на гликемията на гладно и нивата на anti-AGEs в 24-часова урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,4241$, $p=0,0312$) (Фиг. 48).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на постпрандиалната гликемия и нивата на anti-AGEs в 24-часова урина при пациентите със ЗД (Spearman, one-tailed, $r=0,2301$, $p=0,1646$).

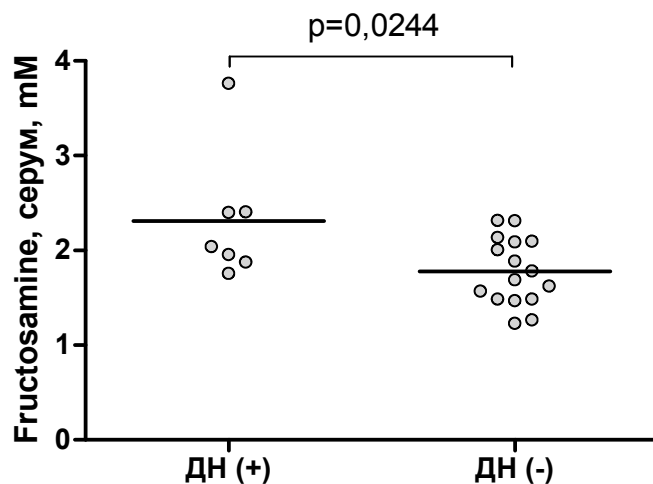
ИЗВОДИ:

1. Липсват значими връзки на серумните и уринните нива на фруктозамина с възрастта и продължителността на диабета, като единствено при фруктозамина в серума е налице повишаване на нивата с нарастване на давността на ЗД ИНЗТ.
2. Липсват значими връзки на серумните и уринните нива на N-(ε)-CML с възрастта и продължителността на диабета, като единствено при N-(ε)-CML в прясна урина е налице намаление на нивата с напредване на възрастта на пациентите.

3. Липсват значими връзки на серумните нива на имидазолоната с възрастта, продължителността на диабета и бъбречната функция.
4. Липсват значими връзки на серумните и уринните нива на anti-AGEs с възрастта, продължителността на диабета и бъбречната функция.
5. Липсват значими връзки на серумните и уринните нива на фруктозамина с бъбречната функция.
6. 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.
7. Липсват значими връзки на серумните и уринните нива на фруктозамина с протеинурията.
8. Липсват значими връзки на серумните и уринните нива на N-(ε)-CML с протеинурията.
9. Липсват значими връзки на серумните нива на имидазолоната с протеинурията.
10. Липсват значими връзки на серумните нива на anti-AGEs с протеинурията при изследваните пациентите със захарен диабет, което показва, че те не участват в патогенезата на диабетната нефропатия.
11. Серумните нива на фруктозамина, N-(ε)-CML и имидазолоната могат да се използват като маркер за гликемичен контрол.
12. Липсват значими връзки на уринните нива на фруктозамина и N-(ε)-CML с гликемията.
13. Липсват значими връзки на серумните нива на anti-AGEs с гликемията.

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.

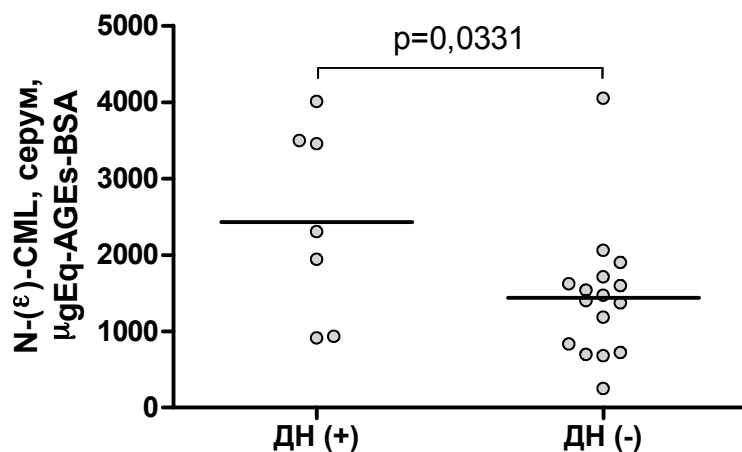


Фигура 49. Сравнителен анализ на серумните нива на фруктозамина при пациенти с диабетна нефропатия и при пациенти без диабетна нефропатия

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. 49).

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

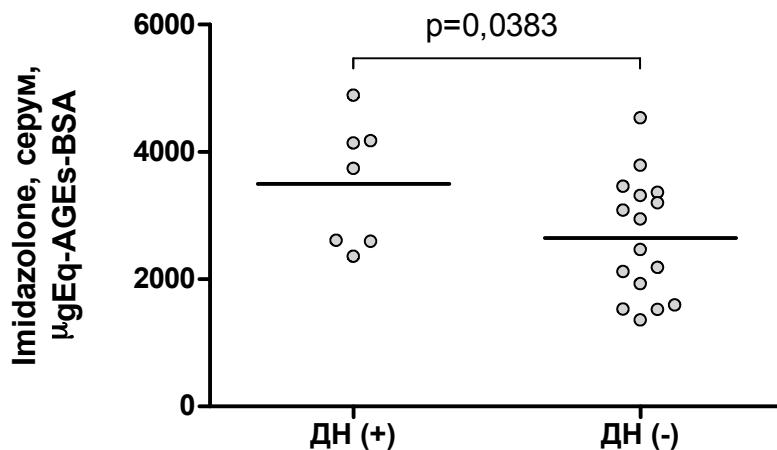
Таблица 13. Разпределение на пациентите със ЗД според серумните нива на N-(ε)-CML и наличието на липсата на ДН.

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±1256,0 µgEq-AGEs-BSA и е значимо по-високо от средното ниво на N-(ε)-CML в серума на пациентите без ДН, което е 1441,0±858,5 µgEq-AGEs-BSA (Mann-Whitney test, one-tailed, p=0,0331) (Фиг. 50).

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 51. Сравнителен анализ на серумните нива на *Imidazolone* 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. 51).

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, $p=0,0672$).

5.4. Anti-AGEs в серум и диабетна нефропатия

Средното ниво на anti-AGEs в серума при пациентите с ДН е $0,1486 \pm 0,0679$ OD 490 nm, докато при пациентите без ДН е $0,1491 \pm 0,656$ OD 490 nm, като няма статистически значима разлика (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,4601$).

Сред пациентите с патологично повишени нива на anti-AGEs в серума ($n=12$), с ДН са 4 (33,3%), докато сред пациентите с референтни нива на anti-AGEs в серума ($n=11$), с ДН са 3 (27,3%). Това разпределение показва, че наличието на патологично

повишени нива на anti-AGEs в серума на пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,5555$).

5.5. Фруктозамин в прясна урина и диабетна нефропатия

Средното ниво на фруктозамин в прясна урина при пациентите с ДН е $0,5100\pm 0,1074$ mM, докато при пациентите без ДН е $0,5850\pm 0,6335$ mM, като няма статистически значима разлика (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,2855$).

Сред пациентите с патологично повишени нива на фруктозамин в прясна урина ($n=3$), с ДН са 0 (0%), докато сред пациентите с референтни нива на фруктозамин в прясна урина ($n=13$), с ДН са 5 (38,5%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на фруктозамин в прясна урина на пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,2946$).

5.6. Фруктозамин в 24-часова урина и диабетна нефропатия

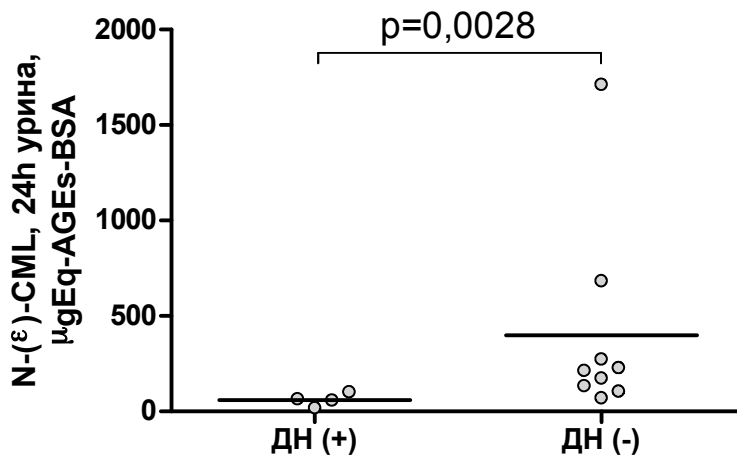
Средното ниво на фруктозамин в 24-часова урина при пациентите с ДН е $0,4290\pm 0,1485$ mM, докато при пациентите без ДН е $0,5055\pm 0,2745$ mM, като няма статистически значима разлика (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,3472$).

Сред пациентите с патологично повишени нива на фруктозамин в 24-часова урина ($n=2$), с ДН са 0 (0%), докато сред пациентите с референтни нива на фруктозамин в 24-часова урина ($n=18$), с ДН са 5 (27,8%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на фруктозамин в 24-часова урина на пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,5526$).

5.7. N-(ε)-CML в прясна урина и диабетна нефропатия

Средното ниво на N-(ε)-CML в прясна урина при пациентите с ДН е $380,3\pm 403,4$ μgEq-AGEs-BSA, докато при пациентите без ДН е $834,3\pm 1508,0$ μgEq-AGEs-BSA, като няма статистически значима разлика (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,2810$).

Сред пациентите с патологично повишени нива на N-(ε)-CML в прясна урина ($n=4$), с ДН е 1 (25,0%), докато сред пациентите с референтни нива на N-(ε)-CML в прясна урина ($n=13$), с ДН са 4 (30,8%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в прясна урина на пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,6702$).

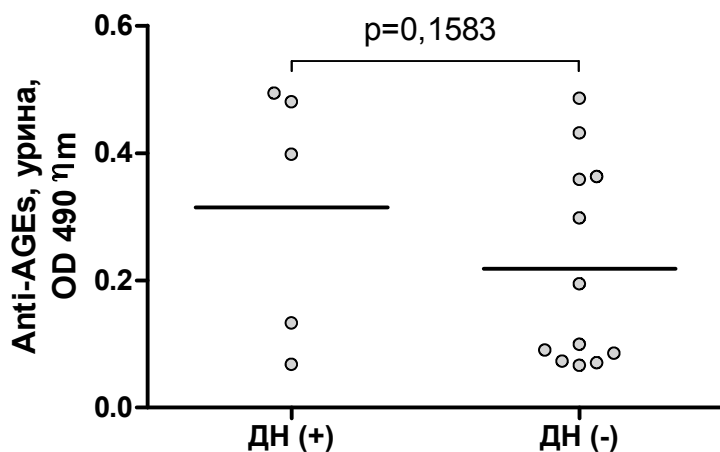


Фигура 52. Сравнителен анализ на нивата N-(ε)-CML в 24 часова урина при пациенти с диабетна нефропатия и при пациенти без диабетна нефропатия

5.8. N-(ε)-CML в 24-часова урина и диабетна нефропатия

Средното ниво на N-(ε)-CML в 24-часова урина при пациентите с ДН е $61,38 \pm 34,15$ μgEq-AGEs-BSA, докато при пациентите без ДН е $399,9 \pm 524,5$ μgEq-AGEs-BSA, като последното е статистически значимо по-висок (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,0028$) (фиг. 52).

Сред пациентите с патологично повишени нива на N-(ε)-CML в 24-часова урина ($n=2$), с ДН са 0 (0%), докато сред пациентите с референтни нива на N-(ε)-CML в 24-часова урина ($n=11$), с ДН са 4 (36,4%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на N-(ε)-CML в 24-часова урина при пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,4615$).

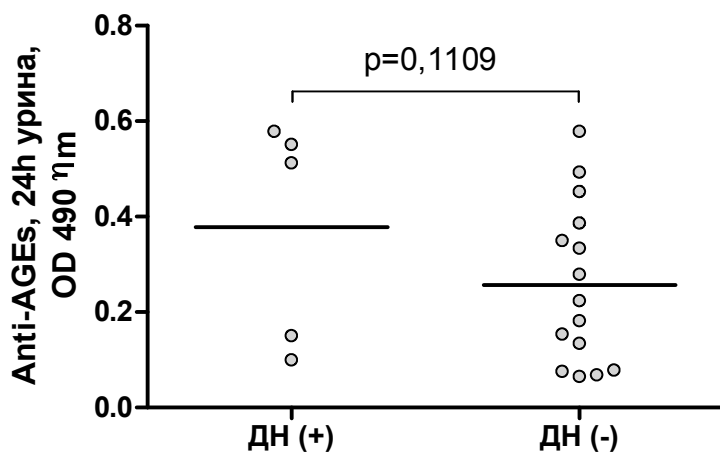


Фигура 53. Сравнителен анализ на нивата *Anti-AGEs* в прясна урина при пациенти с диабетна нефропатия и при пациенти без диабетна нефропатия

5.9. Anti-AGEs в прясна урина и диабетна нефропатия

Средното ниво на anti-AGEs в прясна урина при пациентите с ДН е $0,3146 \pm 0,2004$ OD 490 nm, докато при пациентите без ДН е $0,2181 \pm 0,1592$ OD 490 nm, като няма статистически значима разлика (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,1583$) (Фиг. 53).

Сред пациентите с патологично повишени нива на anti-AGEs в прясна урина ($n=8$), с ДН са 3 (37,5%), докато сред пациентите с референтни нива на anti-AGEs в прясна урина ($n=9$), с ДН са 2 (22,2%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на anti-AGEs в прясна урина при пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,4367$).



Фигура 54. Сравнителен анализ на нивата Anti-AGEs в 24-часова урина при пациенти с диабетна нефропатия и при пациенти без диабетна нефропатия

5.10. Anti-AGEs в 24-часова урина и диабетна нефропатия

Средното ниво на anti-AGEs в 24-часова урина при пациентите с ДН е $0,3783 \pm 0,2333$ OD 490 nm, докато при пациентите без ДН е $0,2569 \pm 0,1687$ OD 490 nm, като няма статистически значима разлика (Mann-Whitney test, one-tailed, $p=0,1109$) (Фиг. 54).

Сред пациентите с патологично повишени нива на anti-AGEs в 24-часова урина ($n=9$), с ДН са 3 (33,3%), докато сред пациентите с референтни нива на anti-AGEs в 24-часова урина ($n=11$), с ДН са 2 (18,2%). Това разпределение показва, че наличието на патологично повишени нива на anti-AGEs в 24-часова урина при пациентите със ЗД не определя статистически значимо наличието на диабетна нефропатия (Fisher's exact test, one-sided, $p=0,3955$).

ИЗВОДИ:

1. N-(ε)-CML може да се използва като неинвазивен биомаркер за диабетна нефропатия, тъй като патологично повишените нива на N-(ε)-CML в серума на пациентите със ЗД определят 4.8 пъти по-висок риск за наличие на диабетна нефропатия.
2. Липсва значима връзка между серумните и уринните нива на фруктозамина и диабетната нефропатия.
3. Липсва значима връзка между серумните нива на имидазолна и диабетната нефропатия.

4. Липсва значима връзка между серумните и уринните нива на anti-AGEs и диабетната нефропатия.
5. Липсва значима връзка между уринните нива на N-(ε)-CML и диабетната нефропатия.

VI. 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 Jaga 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 диабетиците 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 диабетиците 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 диабетиците 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.

Многобройни изследвания са фокусирани на въздействието на бъбречната функция върху нивата на AGEs. Според проучването на Wagner и сътр., Yamagishi и сътр., Liew-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 очистване 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 креатинов клиърънс. 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. Kushimoro 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 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 алдозазна 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 диабетиците, 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 диабетиците 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 диабетици, 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 диабетиците и продължителността на диабета. Единствено Vay и сътр. установяват в своето проучване, че наличието на анти-CML IgG при диабетици 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

биопсирани болни, вероятно поради спазване на индикациите за провеждане на манипулацията при диабетци.

Разнопосочни са данните за типът на морфологичните изменения, отчетени с ПББ при диабетците. 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 диабетците, 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 диабетци 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 Arif и сътр., Vermejo и сътр., Yuun и сътр. по-ниската протеинурия се асоциира с НДБЗ, което е противоположно на проучванията на Sharma и сътр., които свързват 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 Yuun 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 резултатите 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 ДПНП като маркер за разграничаване на ДН от НДБЗ. Според данните от нашето проучване ДПНП 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 Arif 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.

VII. 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 имидазолон 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.

VIII. 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 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.

IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Богов Б. и Георгиев Б., Кардиоренален синдром, 2019, с. 191-2005.
2. Ненов Д., Справочник по Нефрология, 2018, с. 65-75.
3. Паскалев Е., Нефрология, 2015, с. 295-312.
4. Ahmed AM. History of diabetes mellitus. Saudi Med J. 2002; 23(4):373-8.
5. Ahmed KA, Muniandy S and Ismail IS. Role of N^ε-(Carboxymethyl)-Lysine in the Development of Ischemic Heart Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. J Clin Biochem Nutr. 2007; 41(2):97–105.
6. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; Diabetes Care. 2010; 33(1):62–69.
7. Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS et al. Glycation of human serum albumin. Clin Chim Acta. 2013; 425:64-76.
8. Arif M, Arif MK, Arif MS. An evaluation of renal biopsy in type-II diabetic patients. J Coll Physicians Surg Pak. 2009; 19(10):627-31.
9. Bermejo S, Soler MJ, Gimeno J et al. Predictive factors for non-diabetic nephropathy in diabetic patients. The utility of renal biopsy. Nefrologia. 2016; 36(5):535-544.
10. Bhadauria D, Chellappan A, Kaul A et al. Idiopathic membranous nephropathy in patients with diabetes mellitus: a diagnostic and therapeutic quandary! Clin Kidney J. 2018; 11(1):46-50.
11. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. Ann Intern Med. 1984 Oct;101(4):527-37.
12. Bui TPN, Troise AD, Fogliano V et al. Anaerobic Degradation of N-ε-Carboxymethyllysine, a Major Glycation End-Product, by Human Intestinal Bacteria. J Agric Food Chem. 2019; 67(23):6594-6602.
13. Busch M, Franke S, Wolf G et al. The advanced glycation end product N(epsilon)-carboxymethyllysine is not a predictor of cardiovascular events and renal outcomes in patients with type 2 diabetic kidney disease and hypertension. Am J Kidney Dis. 2006; 48(4):571-9.
14. Byun JM, Lee CH, Lee SR et al. Renal outcomes and clinical course of nondiabetic renal diseases in patients with type 2 diabetes. Korean J Intern Med. 2013; 28(5):565-72.
15. Caramori ML. Should all patients with diabetes have a kidney biopsy? Nephrol Dial Transplant. 2017; 32(1):3-5.

16. Castellano I, Covarsí A, Novillo R et al. Renal histological lesions in patients with type II diabetes mellitus. *Nefrologia*. 2002; 22(2):162-9.
17. Chan CL, Pyle L, Kelsey M et al. Screening for type 2 diabetes and prediabetes in obese youth: evaluating alternate markers of glycemia - 1,5-anhydroglucitol, fructosamine, and glycated albumin. *Pediatr Diabetes*. 2016; 17(3):206-11.
18. Chandragiri S., Raju S, Mukku KK et al. Idiopathic nodular glomerulosclerosis: Report of two cases and review of literature. *Indian J Nephrol*. 2016; 26(2):145–148.
19. Chang TI, Park JT, Kim JK et al. Renal outcomes in patients with type 2 diabetes with or without co existing non-diabetic renal disease. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 92(2):198–209.
20. Chawarnkul O, Vareesangthip K, Ongajyooth L et al. Non-diabetic glomerular disease in Type II DM: 10 years experience. *J Med Assoc Thai*. 2009; 92(2):57–60.
21. Chen CW, Drechsler C, Suntharalingam P et al. High Glycated Albumin and Mortality in Persons with Diabetes Mellitus on Hemodialysis; *Clin Chem*. 2017; 63(2):477-485.
22. Christensen PK, Larsen S, Horn T et al. Causes of albuminuria in patients with type 2 diabetes without diabetic retinopathy. *Kidney Int*. 2000; 58(4):1719-31.
23. Christensen PK, Larsen S, Horn T et al. Renal function and structure in albuminuric type 2 diabetic patients without retinopathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16(12):2337-47.
24. Clinical Practice Guideline on management of patients with diabetes and chronic kidney disease stage 3b or higher (eGFR <45 mL/min). *Nephrol Dial Transplant*. 2015; 30(2):1–142.
25. Cohen RM, Holmes YR, Chenier TC et al. Discordance Between HbA_{1c} and Fructosamine: Evidence for a glycosylation gap and its relation to diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 2003; 26(1):163-167.
26. Cohen RM, Smith EP. Frequency of HbA_{1c} discordance in estimating blood glucose control. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008; 11(4):512-7.
27. Costa AF, Gomes dos Santos WA, Filho MA et al. Nodular glomerulosclerosis in a non-diabetic hypertensive smoker with dyslipidemia. *Sist Sanit Navar*. 2011; 34(2):301-8.
28. Coughlan MT, Patel SK, Jerums G et al. Advanced glycation urinary protein-bound biomarkers and severity of diabetic nephropathy in man. *Am J Nephrol*. 2011;34(4):347-55.
29. Coughlan MT, Penfold SA, Cooper ME et al. Urinary, but not serum levels of the AGE, n-carboxymethyl-lysine are associated with progressive nephropathy in patients with type 1 and type 2 diabetes. 67th Annual Meeting of the American-Diabetes-Association, San Francisco Ca. 2008 Jun(06-10).

30. Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, and Lippi G. Advantages and Pitfalls of Fructosamine and Glycated Albumin in the Diagnosis and Treatment of Diabetes. *J Diabetes Sci Technol*. 2015; 9(2):169–176.
31. Das U, Dakshinamurthy KD, Prayaga A. et al. Nondiabetic kidney disease in type 2 diabetic patients: A single center experience. *Indian J Nephrol*. 2012; 22(5): 358–362.
32. Delgado-Andrade C. Carboxymethyl-lysine: thirty years of investigation in the field of AGE formation. *Food Funct*. 2016; 7(1):46-57.
33. Desmons Au, Jaisson St, Leroy N et al. Labile glycated haemoglobin and carbamylated haemoglobin are still critical points for HbA_{1c} measurement. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017; 27(2):378–386.
34. Dorcely Br., Katz K, Jagannathan R et. Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2017; 10:345–361.
35. Einbinder Y, Goodman DJ, Haggiag I et al. The spectrum of renal disease in kidney biopsies of diabetic patients a single center experience. *Harefuah*. 2016; 155(3):158-62, 196.
36. El-Shazly AAA, Sallam AM, El-Hefnawy MH et al. Epidermal growth factor receptor and podocin predict nephropathy progression in type 2 diabetic patients through interaction with the autophagy influencer ULK-1. *J Diabetes Complications*. 2019; 33(2):128-133.
37. Erdogmus S, Kiremitci S, Celebi ZK et al. Non-Diabetic Kidney Disease in Type 2 Diabetic Patients: Prevalence, Clinical Predictors and Outcomes. *Kidney Blood Press Res*. 2017; 42:886–893.
38. Espinel E, Agraz I, Ibernon M. et al. Renal biopsy in type 2 diabetic patients. *J Clin Med* 2015; 4(5):998–1009.
39. Filippone EJ, Abubacker F, Farber JL. Posttransplantation normoglycemic diabetic nephropathy: the role of the allograft insulin resistance-a case report. *Transplant Proc*. 2014; 46(7):2381-5.
40. Filippone EJ, Gupta A, Farber JL. Normoglycemic diabetic nephropathy: the role of insulin resistance. *Case Rep Nephrol Urol*. 2014; 4(2):13.
41. Fioretto P. and Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007; 27(2):195–207.
42. Fiorentino M., Bolignano D, Tesar V et al. Renal biopsy in patients with diabetes: a pooled meta-analysis of 48 studies. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2017; 32(1):97–110.
43. Fogo A, Qureshi N, Horn RG. Morphologic and clinical features of fibrillary glomerulonephritis versus immunotactoid glomerulopathy. *Am J Kidney Dis*. 1993; 22:367–

77.

44. Gallo GR, Feiner HD, Katz LA et al. Nodular glomerulopathy associated with nonamyloidotic kappa light chain deposits and excess immunoglobulin light chain synthesis. *Am J Pathol.* 1980; 99(3):621–44. .

45. Genuth S, Sun W, Cleary P et al. Glycation and Carboxymethyllysine Levels in Skin Collagen Predict the Risk of Future 10-Year Progression of Diabetic Retinopathy and Nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Participants With Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2005; 54(11):3103-3111.

46. Ghanem AA, Elewa A, Arafa LF. Pentosidine and N-carboxymethyl-lysine: biomarkers for type 2 diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol.* 2011; 21(1):48-54.

47. Ghani AA, Al Waheeb S, Al Sahow A et al. Renal biopsy in patients with type 2 DM: Indications and nature of the lesions. *Ann Saudi Med.* 2009; 29:450–3.

48. Gheith O, Farouk N, Nampoory N et al. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J Nephroarmacol.* 2015; 5(1):49-56.

49. Goh SU, Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(4):1143-52.

50. Goldin A, Beckman Jo, Schmidt AM et al. Advanced Glycation End Products. *Circulation.* 2006; 114(6):597-605.

51. Gonzalez Suarez ML, Thomas DB, Barisoni L et al. Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy? *World J Diabetes.* 2013; 4(6):245-55.

52. Gopaliah L, Lakshminarayana Sh., Nalumakkal S. Nondiabetic renal disease in type 2 diabetes mellitus. *JINA* 2017; 4(1):21-25.

53. Halmai R, Degrell P, Szijártó IA et al. Smoking as the potential link between Kimmelstiel-Wilson lesion and non-diabetic nodular glomerulosclerosis in male patients - a single center retrospective study. *Clin Nephrol.* 2013; 80(1):23-8.

54. Hammes HP, Brownlee M, Lin J et al. Diabetic retinopathy risk correlates with intracellular concentrations of the glycoxidation product Nepsilon-(carboxymethyl) lysine independently of glycohaemoglobin concentrations. *Diabetologia.* 1999; 42(5):603-7.

55. Harada K, Akai Y, Sumida K, Yoshikawa M. et al. Significance of renal biopsy in patients with presumed diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig.* 2013 Jan 29;4(1):88-93.

56. Hasegawa S, Jao TM, Inagi R, Dietary Metabolites and Chronic Kidney Disease. *Nutrients.* 2017; 9(4).

57. He F, Xia X, Wu XF et al. Diabetic retinopathy in predicting diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes and renal disease: A meta-analysis. *Diabetologia.* 2013;

56(3):457–66.

58. Herzenberg AM, Holden JK, Singh S et al. Idiopathic nodular glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis.* 1999; 34(3):560-4.

59. Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Mechanisms of metabolic memory and renal hypoxia as a therapeutic target in diabetic kidney diseases. *J Diabetes Investig.* 2017; 8(3):261-271.

60. Hirata K, Kubo K. Relationship between Blood Levels of *N*-Carboxymethyl-lysine and Pentosidine and the Severity of Microangiopathy in Type 2 Diabetes. *Endocr J.* 2004; 51(6):537-44.

61. Hirukawa H, Kamei S, Kimura T et al. Administration of RAS Inhibitor before the Onset of Diabetic Nephropathy Counteracts the Adverse Effect of Chronic Hyperglycemia and Reduces the Augmentation of Urinary Albumin Excretion: A Retrospective Clinical Study. *J Diabetes Res.* 2018; 7:9435401.

62. Horie K, Miyata T, Maeda K et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest.* 1997; 100(12):2995-3004.

63. Horvatic I, Tisljar M, Kacinari P, Matesic I et al. Non-diabetic renal disease in Croatian patients with type 2 diabetes mellitus.; *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 104(3):443-50.

64. Hung CC, Lin HY, Hwang DY et al. Diabetic Retinopathy and Clinical Parameters Favoring the Presence of Diabetic Nephropathy could Predict Renal Outcome in Patients with Diabetic Kidney Disease. *Sci Rep.* 2017; 7(1):1236-9.

65. Imbasciati E, Gherardi G, Morozumi K et al. Collagen type III glomerulopathy: A new idiopathic glomerular disease. *Am J Nephrol.* 1991; 11:422–9.

66. Innes A, Furness PN, Cotton RE et al. Diabetic glomerulosclerosis without diabetes mellitus--two case reports and a review of the literature. *Nephrol Dial Transplant.* 1992; 7(7):642-6.

67. Jalalah SM. Non-diabetic renal disease in diabetic patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2008; 19(5):813–6.

68. Jara N, Leal MJ, Bunout D, Hirsch S et al. Dietary intake increases serum levels of carboxymethyl-lysine (CML) in diabetic patients. *Nutr Hosp.* 2012; 27(4):1272-8.

69. Jerntorp P, Sundkvist G, Fex G et al. Clinical utility of serum fructosamine in diabetes mellitus compared with hemoglobin A1c. *Clin Clim Acta.* 1988; 175(2):135-142.

70. Jo Y, Ichihara A, Eguchi T et al. A case of diabetic glomerulosclerosis without concurrent diabetes mellitus. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.* 2002; 44(7):552-7.

71. KDOQI Clinical Practice Guideline Diabetes and CKD, 2007, Guidelines 1.3 and 1.4. Screening and diagnosis of DKD. *Am J Kidney Dis* 2007; 49(2):1–180.
72. Kharroubi AT and Darwish Hm. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015; 6(6):850–867.
73. Kikuta T, Inoue T, Watanabe Y et al. Association between long-term smoking and hypertension and early-onset nodular glomerulosclerosis. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 2010; 52(7):959-65.
74. Kim MK, Sun J, Kwon HS et al. Concordance the hemoglobin glycation index with glycation gap using glycated albumin in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2017; 31(7):1127-1131.
75. Kimmelstiel P, Wilson C. Intercapillary Lesions in the Glomeruli of the Kidney. *Am. J. Pathol.* 1936; 12:83–98.
76. Kinaan M, Yan H, Martinez S, Kar Pr. Concepts in Diabetic Nephropathy: From Pathophysiology to Treatment. *Journal of Renal and Hepatic Disorders*. 2017; 2(1).
77. Klein R, Horak K, E. Lee K et al. The Relationship of Serum Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) and Carboxymethyl Lysine (CML) to the Incidence of Diabetic Nephropathy in Persons With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2017; 40(9):117–119.
78. Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF et al. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes*. 1991; 40(2):190-6.
79. Kobayashi K, Harada A, Onoyama K et al. Idiopathic membranous glomerulonephritis associated with diabetes mellitus: Light, immunofluorescence and electron microscopic study. *Nephron*. 1981; 28:163–8.
80. Konya J, Ng JM; Cox H et al. Use of complementary markers in assessing glycaemic control in people with diabetic kidney disease undergoing iron or erythropoietin treatment. *Diabet Med*. 2013; 30(10):1250-4.
81. Koskinen P, Irjala K, Viikari J et al. Serum fructosamine in the assessment of glycaemic control in diabetes mellitus. *Scand. J Clin Lab Invest*. 1987; 47(3):185-92.
82. Kotlarsky P, Bolotin A, Dorfman K. Link between retinopathy and nephropathy caused by complications of diabetes mellitus type 2. *Int Ophthalmol*. 2015; 35:59–66.
83. Kumeda Y; Shoji Sh, Ishimura E et al. Significant correlation of glycated albumin, but not glycated haemoglobin, with arterial stiffening in haemodialysis patients with type 2 diabetes. *Clin Endocrinology*. 2008; 69(4):556-61.
84. Kusaba T, Hatta T, Sonomura K et al. Idiopathic nodular glomerulosclerosis: three

Japanese cases and review of the literature. *Clin Nephrol.* 2007; 67(1):32-7.

85. Kushiro M, Shikata K, Sugimoto H et al. Accumulation of Nsigma-(carboxymethyl)lysine and changes in glomerular extracellular matrix components in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat: a model of spontaneous NIDDM. *Nephron.* 1998; 79(4):458-68.

86. Lakhtakia R. The History of Diabetes Mellitus; *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2013; 13(3):368–370.

87. Lee WJ, Sobrin L, Lee MJ et al. The relationship between diabetic retinopathy and diabetic nephropathy in a population-based study in Korea (KNHANES V-2, 3). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(10):6547-53.

88. Lee YH, Kim KP, Kim YG et al. Clinicopathological features of diabetic and nondiabetic renal diseases in type 2 diabetic patients with nephrotic-range proteinuria. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(36):8047.

89. Lee, MJ, Kwon YE, Park KS et al. Glycemic Control Modifies Difference in Mortality Risk Between Hemodialysis and Peritoneal Dialysis in Incident Dialysis in Incident Dialysis Patients with Diabetes; Results from a Nationwide prospective Cohort in Korea. *Medicine.* 2016; 95(11):3118.

90. Li H, Li XW, Huang QY et al. Non-diabetic renal disease in type II diabetes mellitus. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2003; 25(1):101-4.

91. Li W, Verani RR. Idiopathic nodular glomerulosclerosis: a clinicopathologic study of 15 cases. *Hum Pathol.* 2008; 39(12):1771-6.

92. Li XQ, Zheng X, Chen M et al. Characteristics of diabetic nephropathy patients without diabetic retinopathy: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(18):6805.

93. Liang KV, Greene EL, Oei LS et al. Nodular glomerulosclerosis: renal lesions in chronic smokers mimic chronic thrombotic microangiopathy and hypertensive lesions. *Am J Kidney Dis.* 2007; 49(4):552-9.

94. Lieuw-A-Fa MLM, Hinsbergh MWV, Teerlink T et al. Increased levels of N^ε-(carboxymethyl)-lysine and N^ε-(carboxyethyl)-lysine in type 1 diabetic patients with impaired renal function: correlation with markers of endothelial dysfunction. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004; 19(3):631–636.
95. Lin YC, Chang YH, Yang SY et al. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc*. 2018; 117(8):662-675.
96. Lin YL, Peng SJ, Ferng SH et al. Clinical indicators which necessitate renal biopsy in type 2 diabetes mellitus patients with renal disease. *Int J Clin Pract*. 2009; 63:1167–76.
97. Liu D, Huang T, Chen N et al. The modern spectrum of biopsy-proven renal disease in Chinese diabetic patients - a retrospective descriptive study. *Peer J*. 2018; 6:4522.
98. Liu S, Guo Q, Han H et al. Clinicopathological characteristics of non-diabetic renal disease in patients with type 2 diabetes mellitus in a northeastern Chinese medical center: a retrospective analysis of 273 cases. *Int Urol Nephrol*. 2016; 48(10):1691-8.
99. Liu XM, Wang Q, Dong ZY et al. Clinicopathological Features of Nondiabetic Renal Diseases from Different Age Groups: An Observational Cross-sectional Study. *Chin Med J (Engl)*. 2018; 131(24):2953–2959.
100. López-Revuelta K, Abreu AA, Gerrero-Márquez C. Diabetic Nephropathy without Diabetes. *Clin Med*. 2015; 4(7):1403-27.
101. Mak SK, Gwi E, Chan KW et al. Clinical predictors of non-diabetic renal disease in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12(12):2588-91.
102. Mandalenakis N, Mendoza N, Pirani CL et al. Lobular glomerulonephritis and membranoproliferative glomerulonephritis: A clinical and pathologic study based on renal biopsies. *Medicine (Baltimore)*. 1971; 50(4):319-55.
103. Manikowski St. and Atta M. Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *J Diabetes Res*. 2015;
104. Markowitz GS, Lin J, Valeri AM et al. Idiopathic nodular glomerulosclerosis is a distinct clinicopathologic entity linked to hypertension and smoking. *Hum Pathol*. 2002; 33(8):826-35.
105. McFarlane Ph, Cherney D, Gilbert R.E. Chronic Kidney Disease in Diabetes; Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee. 2018; 42:201-209.
106. Mironova R, Ivanov I, Lozanovc V et al. Anti-carbonyl activity of vitamin B6: 3-Deoxyglucosone trapping by pyridoxal 5'-phosphate in vitro and in vivo.
107. Morgan, L, Marenah CB, Jeffcoate WJ et al. glycated protein as indices of glycaemic

- control in diabetic patients with chronic renal failure. *Diabet Med.* 1996; 13(6):514-9.
108. Nasr SH, D'Agati VD. Nodular glomerulosclerosis in the nondiabetic smoker. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(7):2032-6. .
109. Navaneethan SD, Singh S, Choudhry W. Nodular glomerulosclerosis in a non-diabetic patient: case report and review of literature. *J Nephrol.* 2005; 18(5):613-5.
110. Neelofar K, Ahmad J. Glycosylation Gap in Patients with Diabetes with Chronic Kidney Disease and Healthy Participants: A Comparative Study. *Indian J Endocrinol Metab.* 2017; 21(3):410-414.
111. Negoro H, Morley JE, Rosenthal MJ. Utility of serum fructosamine as a measure of glycemia in young and old diabetic and non-diabetic subjects. *Am J Med.* 1988; 85 (3):360-4.
112. Ng WY, Thai AC, Lui KF et al. Serum fructosamine determination as an index of glycaemic control: comparison between an automated and manual method, and the effect of serum storage. *Annals of the Academy of Medicine,* 1989, 18(4):352-356.
113. Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T et al. Imidazolone, a novel advanced glycation end product, is present at high levels in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett.* 1997; 407(3):297-302.
114. Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T et al. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients.; *J Clin Invest.* 1997; 99(6):1272–1280.
115. Niwa T, Tsukushi S. 3-deoxyglucosone and AGEs in uremic complications: inactivation of glutathione peroxidase by 3-deoxyglucosone. *Kidney Int Suppl.* 2001; 78:S37-41.
116. Niwa T. 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 731(1):23-36.
117. Odani H, Matsumoto Y, Shinzato T et al.. Mass spectrometric study on the protein chemical modification of uremic patients in advanced Maillard reaction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 731(1):131-40.
118. Parrinello CM, Selvin El. Beyond HbA1c and Glucose: the Role of Nontraditional Glycemic Markers in Diabetes Diagnosis, Prognosis, and Management; *Current Diabetes Reports.* 2014; 14(11):548.
119. Pedro RA, Ramon SA, Marc BB et al. Prevalence and relationship between diabetic retinopathy and nephropathy, and its risk factors in the North-East of Spain, a population-based study. *Ophthalmic Epidemiol.* 2010; 17(4):251-65.

120. Penescu M, Mandache E. The value of kidney biopsy in diabetes mellitus. *Rom J MorpholEmbryol.* 2010; 51(1):13-9
121. Peng YF and Wei YS. The relationships between serum fructosamine concentrations and lipid profiles in community-dwelling adults. *Sci Rep.* 2017; 7:6886.
122. Peng YF, Cao WY, Zhao JM, Cao L et al. Association between Serum Fructosamine and Kidney Function in Nondiabetic Individuals without Chronic Kidney Disease.: *Med Sci Monit.* 2015; 21:1996-9.
123. Pham TT, Sim JJ, Kujubu DA et al. Prevalence of non diabetic renal disease in Diabetic patients. *Am J Nephrol.* 2007; 27:322–8.
124. Piccoli GB, Grassi G, Cabiddu G et al. Diabetic Kidney Disease: A Syndrome Rather Than a single disease. *Rev Diabet Stud.* 2015; 12(1-2):87-109.
125. Prakash J, Lodha M, Singh SK et al. Diabetic retinopathy is a poor predictor of type of nephropathy in proteinuric type 2 diabetic patients. *J Assoc Physicians India.* 2007; 55:412–6.
126. Prakash J, Sen D, Usha, Kumar NS. Non-diabetic renal disease in patients with type 2 Diabetes mellitus. *J Assoc Physicians India.* 2001; 49:415–20.
127. Prakash J, Gupta T, Prakash S et al. Non-diabetic renal disease in type 2 diabetes mellitus: Study of renal - retinal relationship. *Indian J Nephrol.* 2015; 25(4):222-8.
128. Prakash J. Non-diabetic renal disease (NDRD) in patients with type 2 diabetes mellitus (type 2 DM). *J Assoc Physicians India.* 2013; 61(3):194-9.
129. Raparia K, Usman I, Kanwar YS. Renal morphologic lesions reminiscent of diabetic nephropathy. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137(3):351-9.
130. Rashe FM, Ebert T, Beckman J et al. Influence of erythropoiesis-Stimulaing Agents on HbA1c on HbA1c and Fructosamine in Patients with Haemodialysis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2017; 125(6):384-391.
131. Ribeiro RT, Macedo MP, Raposo JF. HbA1c, Fructosamine, and Glycated Albumin in the Detection of Dysglycaemic Conditions. *Curr Diabetes Rev.* 2016; 12(1):14-9.
132. Riveline JP, Teynie J, Belmouaz S et al. Glycaemic control in type 2 diabetic patients on chronic haemodialysis: use of a continuous glucose monitoring system. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24(9):2866-71
133. Rohilla A, Tiwari S, Rohilla S et al. Diabetic Nephropathy: Pathogenesis, Prevention and Treatment *European Journal of Experimental Biology;* 2015; 25(4):222-8.
134. Salvatore SP, Troxell ML, Hecox D et al. Smoking-related glomerulopathy: expanding the morphologic spectrum. *Am J Nephrol.* 2015; 41(1):66-72.

135. Sanai T, Okuda S, Yoshimitsu T et al. Nodular glomerulosclerosis in patients without any manifestation of diabetes mellitus. *Nephrology (Carlton)*. 2007; 12(1):69-73.
136. Saulnier P, Wheelock K, Howell S et al. Advanced Glycation End Products Predict Loss of Renal Function and Correlate With Lesions of Diabetic Kidney Disease in American Indians With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2016; 65(12): 3744-3753.
137. Schena Fr. and Gesualdo L. Pathogenetic Mechanisms of Diabetic Nephropathy. *JASN*. 2005; 16(1):30-33.
138. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 1997; 99(3):457-468.
139. Selvin EL, Rawlings AM; Grams M et al. Fructosamine and glycated albumin for risk stratification and prediction of incident diabetes and microvascular complications: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study; *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014; 4(2):279-288.
140. Semba RD, Patel KV, Sun K et al. Association of Serum Carboxymethyl-lysine, a Dominant Advanced Glycation End Product, with Anemia in Adults: The Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Am Geriatr Soc*. 2008; 56(11):2145-2147.
141. Serra A, Romero R, Bayés B et al. Is there a need for changes in renal biopsy criteria in proteinuria in type 2 diabetes? *Diabetes Res Clin Pract*. 2002; 58:149-53.
142. Sharma Sh, Bomback An, Radhakrishnan J et al. The Modern Spectrum of Renal Biopsy Findings in Patients with Diabetes; *CJASN*. 2013; 8(10):1718-1724.
143. Sheila Bermejo, Julio Pascual, Maria José Soler. The large spectrum of renal disease in diabetic patients. *Clin Kidney J*. 2017; 10(2):255-256.
144. Shibayama R, Araki N, Nagai R et al. Autoantibody against N(epsilon) (carboxymethyl) lysine: an advanced glycation end product of the Maillard reaction. *Diabetes*. 1999; 48(9):1842-1849.
145. Shimoike T, Inoguchi T, Umeda F et al. The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Metabolism*. 2000; 49(8):1030-5.
146. Singh PV, Bali An, Singh N et al. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014; 18(1):1-14.
147. Singh R, Barden A, Mori T et al. Advanced glycation end-products: a review; *Diabetologia*. 2001; 44(2):129-146.
148. Soni SS, Gowrishankar S, Kishan AG et al.. Non diabetic renal disease in type 2 diabetes mellitus. *Nephrology (Carlton)*. 2006; 11(6):533-7.

149. Suarez ML, Thomas DB, Barisoni L et al. Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy? *World J Diabetes*. 2013; 4(6):245–255.
150. Taervert TWC, Mooyaart AL, Amann K. et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21:556–563.
151. Takayama F, Aoyama I, Tsukushi S et al. Immunohistochemical detection of imidazolone and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in aortas of hemodialysis patients. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. 1998; 44(7):1101-1109.
152. Takeuchi M, Makita Z, Yanagisawa K et al. Detection of noncarboxymethyllysine and carboxymethyllysine advanced glycation end products (AGE) in serum of diabetic patients. *Mol Med*. 1999 Jun; 5(6):393-405.
153. Tan J, Zwi LJ, Collins JF, Marshall MR et al. Presentation, pathology and prognosis of renal disease in type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2017; 5(1):000412
154. Tanju N, Markowitz GS, Fu C and al. Expression of Advanced Glycation End Products and Their Cellular Receptor RAGE in Diabetic Nephropathy and Nondiabetic Renal Disease. *JASN*. 2000; 11(9):1656-1666.
155. Teng J, Dwyer KM, Hill P et al. Spectrum of renal disease in diabetes. *Nephrology (Carlton)*. 2014; 19(9):528-36.
156. Tsekovska R, Sredovska-Bozhinova A, Niwa T et al. Maillard reaction and immunogenicity of protein therapeutic. *World J Immunol*. 2016; 6(1):19-38.
157. Tsukushi S, Katsuzaki T, Aoyama I et al. Increased erythrocyte 3-DG and AGEs in diabetic hemodialysis patients: role of the polyol pathway. *Kidney Int*. 1999; 55(5):1970-6.
158. Turk N, Mornar A, Mrzljak V et al. Urinary excretion of advanced glycation endproducts in patients with type 2 diabetes and various stages of proteinuria. *Diabetes Metab*. 2004; 30(2):187-92.
159. Uchida T, Oda T, Watanabe A et al. Idiopathic nodular glomerulosclerosis in a never-smoking, normotensive, non-obese, normal-glucose-tolerant middle-aged woman. *Clin Kidney J*. 2012; 5(5):445-8.
160. Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S et al. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(24):11704-8.
161. Vos FE, Schollum JB, Coulter CV et al. Assessment of markers of glycaemic control in diabetic patients with chronic kidney disease using continuous glucose monitoring. *Nephrology (Carlton)*. 2011; 17(2):182-8.
162. Wagner Z, Wittmann I, Mazák I et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine levels in

patients with type 2 diabetes: role of renal function. *Am J Kidney Dis.* 2001 Oct; 38(4):785-91.

163. Waldherr R, Ilkenhans C, Ritz E. How frequent is glomerulonephritis in diabetes mellitus type II? *Clin Nephrol.* 1992; 37:271–3.

164. Wautier MP, Massin P, Guillausseau PJ, Huijberts M et al. N(carboxymethyl)lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab.* 2003; 29(1):44-52

165. Wihler C, Schäfer S, Schmid K et al. Renal accumulation and clearance of advanced glycation end-products in type 2 diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme and vasopeptidase inhibition. *Diabetologia.* 2005; 48(8):1645–1653.

166. Wilfred DC, Mysorekar VV, Venkataramana RS et al. Nondiabetic Renal Disease in type 2 Diabetes Mellitus Patients: A Clinicopathological Study. *J Lab Physicians.* 2013; 5(2):94-9.

167. Willans ME, Mittman N, Ma L et al. The Glycemic Indices in Dialysis Evaluation (GIDE) study: Comparative measures of glycemic control in diabetic dialysis patients. *Hemodial. International* 2015; 19(4):562-71.

168. Willms B, Lehmann P; A new fructosamine test--as a routine parameter in the control of diabetes; *Wiener Klinische Wochenschrift. Supplementum*; 1990, 180:5-10.

169. Wu J, Yu S, Tejwani V, Mao M et al. Idiopathic nodular glomerulosclerosis in Chinese patients: a clinicopathologic study of 20 cases; *Clin Exp Nephrol.* 2014 Dec; 18(6):865-75.

170. Xiao-Qian Li, Xin Zheng, Min Chen et al. Characteristics of diabetic nephropathy patients without diabetic retinopathy. A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(18):680.

171. Yamagishi Sh and Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2010; 3(2):101-8.

172. Yenigun E.C, Dede F, Ozturk R et al. Non-Diabetic renal disease in Diabetes Mellitus: clinical features and renal biopsy findings. *Hippokratia.* 2015; 19(2):148–152.

173. Yoshikawa Y, Truong LD, Mattioli CA et al. Membranous glomerulonephritis in diabetic patients: A study of 15 cases and review of the literature. *Mod Pathol.* 1990; 3:36–42

174. Yoshimura M, Kida H, Saito Y et al. Peculiar glomerular lesions in Takayasu's arteritis. *Clin Nephrol.* 1985; 24:120–7.

175. Zajac J, Shrestha A, Patel P et al. The Main Events in the History of Diabetes Mellitus. *Principles of Diabetes Mellitus*; 2009; 11:3-16.

176. Zeni L, Norden AGW, Cancarini G et al. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J Nephrol*. 2017; 30(6):701-717.
177. Zhang JY, Fan H, Chen LX et al. Clinical Value of Serum Fructosamine Measurement in Ig A Type Multiple myeloma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2017; 25(2):494-497.
178. Zhou J, Chen X, Xie Y et al. A differential diagnostic model of diabetic nephropathy and non-diabetic renal diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23:1940–5.
179. Zhuo L, Zou G, Li W et al. Prevalence of diabetic nephropathy complicating non-diabetic renal disease among Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Med Res*. 2013; 18:4.

Х. Списък на публикации свързани с темата на 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., Nenchev 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]