

UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Jolanta Sołtysiak

**Ocena wczesnych markerów  
uszkodzenia nerek  
w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci**

ROZPRAWA DOKTORSKA



**Klinika Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej  
I Katedra Pediatrii  
Promotor: prof. dr hab. med. Jacek Zachwieja**

Poznań 2012

## SPIS SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY

ACR	wskaźnik albumina/kreatynina w moczu (ang. albumin/creatinine ratio)
ABPM	całodobowy ambulatoryjny pomiar ciśnienia tętniczego
AGE	produkty zaawansowanej glikacji białek (ang. advanced glycation endproduct)
AGT	angiotensynogen
AKI	ostre uszkodzenie nerek (ang. acute kidney injury)
Ang II	angiotensyna II
AZT	autoimmunologiczne zapalenie tarczycy
CChN	cukrzycowa choroba nerek
CT1	cukrzyca typu 1
CT2	cukrzyca typu 2
CystC	cystatyna C
DKD	cukrzycowa choroba nerek (ang. diabetic kidney disease)
DMT1	cukrzyca typu 1 (ang. diabetes mellitus type 1)
DMT2	cukrzyca typu 2 (ang. diabetes mellitus type 1)
ESRD	schyłkowa niewydolność nerek (ang. end stage renal disease)
FE <sub>Na</sub>	frakcyjne wydalanie sodu
GBM	błona podstawna kłębuszków nerkowych (ang. glomerular basement membrane)
GFR <sub>F</sub>	przesączanie kłębuszkowe oznaczone metodą Fillera
GH	hormon wzrostu
HbA1c	hemoglobina glikowana
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu
ISPAD	ang. International Society of Pediatric and Adolescent Diabetes
K	stężenie potasu w surowicy
KDOQI	ang. Kidney Disease Outcome Quality Initiative
MA	mikroalbuminuria
Na	stężenie sodu w surowicy
NKF	ang. National Kidney Foundation
PChN	przewlekła choroba nerek
PTD	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne
RAA	układ renina- angiotensyna – aldosteron
RAGE	receptor dla AGE (ang. receptor of advanced glycation end-product)
sIL-18	interleukina 18 obecna w surowicy
sNGAL	lipokaina obojętnochłonna związana z żelatynazą obecna w surowicy
TGF	cewkowo-kłębuszkowe sprzężenie zwrotne (ang. tubuloglomerular feedback)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor-β)
TNFα	czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor α)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)
UA	kwas moczowy we krwi
uAGT	angiotensynogen w moczu
uFABP	białko wiążące kwasy tłuszczowe w moczu
uKatep	katepsyna L obecna w moczu
uIL-18	interleukina 18 obecna w moczu
uNa	stężenie sodu w moczu
uNGAL	lipokaina obojętnochłonna związana z żelatynazą obecna w moczu
uRBP	białko wiążące retinol obecne w moczu
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. vascular endothelial growth factor)

## Spis treści

1	WSTĘP .....	5
1.1	CUKRZYCOWA CHOROBA NEREK .....	6
1.1.1	<i>Definicja CChN</i> .....	6
1.1.2	<i>Przebieg naturalny CChN</i> .....	7
1.2	CZYNNIKI RYZYKA ROZWOJU CChN .....	11
1.2.1	<i>Kontrola glikemii</i> .....	11
1.2.2	<i>Czas trwania cukrzycy i wpływ okresu dojrzewania</i> .....	13
1.2.3	<i>Występowanie powikłań cukrzycy u członków rodziny</i> .....	13
1.2.4	<i>Nadciśnienie tętnicze</i> .....	13
1.2.5	<i>Hiperlipidemia</i> .....	14
1.2.6	<i>Zalecenia dotyczące profilaktycznych badań w kierunku CChN</i> .....	14
1.3	DOTYCHCZASOWE MARKERY OCENY USZKODZENIA NEREK .....	14
1.3.1	<i>Mikroalbuminuria</i> .....	14
1.3.2	<i>Ocena przesączania kłębuszkowego</i> .....	18
1.4	MARKERY WCZESNEGO USZKODZENIA NEREK .....	21
1.4.1	<i>Lipokaina obojętnochłonna związana z żelatynazą (NGAL-neutrophil-gelatinase associated lipocalin)</i> .....	21
1.4.2	<i>Białko wiążące retinol (RBP – retinol binding protein)</i> .....	22
1.4.3	<i>Katepsyna L</i> .....	23
1.4.4	<i>Interleukina 18 (IL-18)</i> .....	24
1.4.5	<i>Angiotensynogen</i> .....	25
1.4.6	<i>Białko wiążące kwasy tłuszczowe typ wątrobowy (L-FABP: liver-type fatty acid binding protein)</i> .....	26
1.5	PODSUMOWANIE .....	27
2	CEL PRACY .....	28
3	MATERIAŁ I METODYKA .....	29
3.1	CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ .....	29
3.2	METODY .....	31
3.2.1	<i>Dotychczasowe markery uszkodzenia nerek i ocena wyrównania metabolicznego cukrzycy</i> .....	31
3.2.2	<i>Markery wczesnego uszkodzenia nerek</i> .....	32
3.2.3	<i>Analiza statystyczna</i> .....	33
4	WYNIKI .....	34
4.1	PORÓWNANIE WYNIKÓW PODSTAWOWYCH BADAŃ LABORATORYJNYCH POMIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ.....	34
4.2	PORÓWNANIE WYNIKÓW OZNACZEŃ MARKERÓW WCZESNEGO USZKODZENIA NEREK W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ .....	35
4.3	CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ W ZALEŻNOŚCI OD WARTOŚCI $GFR_F$ , $uNa$ I $ACR$ , POZIOMU WYRÓWNANIA $CT1$ , CZASU TRWANIA $CT1$ , METODY TERAPII I PŁCI.....	37
4.3.1	<i>Podział grupy badanej ze względu na poziom <math>GFR_F</math></i> .....	37
4.3.2	<i>Podział ze względu na poziom wyrównania metabolicznego cukrzycy</i> .....	41
4.3.3	<i>Podział grupy badanej ze względu na stężenie <math>uNa</math></i> .....	46
4.3.4	<i>Podział grupy w zależności od czasu trwania <math>CT1</math></i> .....	49
4.3.5	<i>Podział grupy badanej w zależności od stężenia <math>ACR</math></i> .....	52
4.3.6	<i>Podział grupy badanej ze względu na metodę stosowanej terapii</i> .....	54

4.3.7	<i>Podział grupy badanej ze względu na płeć</i> .....	55
4.3.8	<i>Podział grupy badanej ze względu na poziom wyrównania cukrzycy i płeć</i> .....	56
4.4	OCENA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY PARAMETRAMI OZNACZANYMI W OBRĘBIE GRUPY BADANEJ .....	58
4.4.1	<i>Ocena zależności pomiędzy wczesnymi markerami uszkodzenia nerek a pozostałymi parametrami w grupie badanej.</i> .....	58
4.4.2	<i>Ocena zależności pomiędzy dotychczasowymi markerami uszkodzenia nerek a pozostałymi parametrami oznaczanymi w grupie badanej</i> .....	60
4.4.3	<i>Ocena zależności pomiędzy czynnikami ryzyka rozwoju nefropatii cukrzycowej a pozostałymi parametrami oznaczanymi w grupie badanej.</i> .....	61
4.4.4	<i>Ocena zależności pomiędzy wybranymi parametrami w grupie chorych z <math>GFR_F</math> powyżej lub poniżej <math>135\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2</math> i w grupie kontrolnej</i> .....	64
5	DYSKUSJA.....	66
6	WNIOSKI:.....	76
7	STRESZCZENIE .....	77
8	SUMMARY .....	80
9	SPIS TABEL .....	82
10	SPIS RYCIN.....	83
11	PIŚMIENNICTWO .....	84

## 1 WSTĘP

Uszkodzenie nerek w przebiegu cukrzycy, określane jako cukrzycowa choroba nerek (CChN), rozwija się u ok. 20-30% osób chorujących zarówno na cukrzycę typu 1 (CT1) jak i typu 2 (CT2) [1,2]. CChN jest na świecie główną przyczyną rozwoju schyłkowej niewydolności nerek u osób dorosłych i stanowi od 20 do 40% pacjentów leczonych nerkozastępczo [1]. CChN prowadząca do przewlekłej choroby nerek (PChN) jest po powikłaniach sercowo-naczyniowych drugą przyczyną śmierci w przebiegu cukrzycy. Wg ostatnich ocen Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) na cukrzycę choruje na świecie ponad 220 milionów ludzi, przy czym liczba ta może być większa ze względu na często skryty przebieg choroby, zwłaszcza CT2 i późne rozpoznanie. Szacuje się, że w 2025 roku liczba ta osiągnie wartość 418 milionów [3].

Cukrzyca i jej powikłania mają znaczący wpływ ekonomiczny na pacjentów, ich rodziny, systemy opieki zdrowotnej i całe kraje. W 2006 roku Zgromadzenie Ogólne Organizacji Narodów Zjednoczonych uznało Światowy Dzień Cukrzycy obchodzony 14 listopada za Dzień Organizacji Narodów Zjednoczonych i po raz pierwszy zaliczono cukrzycę, obok AIDS, do chorób zagrażających światowemu zdrowiu.

Dominującą postacią cukrzycy stanowiącą ok. 90% przypadków jest CT2. Do jej rozwoju dochodzi na skutek wzrostu insulinooporności tkanek obwodowych, której towarzyszy zaburzone i niewystarczające wydzielanie insuliny. Występuje głównie u osób dorosłych, ale coraz częściej chorują dzieci, przede wszystkim młodzież [4,5].

CT1, dawniej nazywana cukrzycą insulinozależną, stanowi jedynie ok. 10% wszystkich przypadków cukrzycy. Spowodowana jest bezwzględny niedoborem insuliny, do którego dochodzi na skutek zniszczenia komórek beta trzustki głównie przez procesy autoimmunologiczne. Jest to cukrzyca typu 1A. Nieznaczny procent przypadków, w którym nie można wykazać wykładników autoagresji, zalicza się do postaci idiopatycznej, typu 1B [5]. CT1 rozwija się głównie u dzieci i młodzieży, ale pojawia się coraz częściej również w późniejszym wieku. W Polsce, wg prof. P. Jarosz – Chobot, w latach 1989 – 2004 stwierdzono 12465 nowych zachorowań na CT1. Wskaźnik zapadalności był największy w grupie dzieci w wieku od 5-ego do 9-ego roku życia i oczekuje się, że w ciągu następnych 15 lat liczba zachorowań wzrośnie trzykrotnie [6].

Pomimo wyodrębnienia różnych typów cukrzycy, konsekwencje metaboliczne i rozwój powikłań są podobne [7]. CChN jest jednym z najczęstszych powikłań występujących w przebiegu cukrzycy, a szybkie jej diagnozowanie ma kluczowe znaczenie dla prewencji zapobiegania rozwojowi groźnych dla życia powikłań [3]. Biorąc pod uwagę częstość występowania i tempo wzrostu zachorowań na różne typy cukrzycy, wczesne rozpoznawanie jej powikłań i możliwość wdrożenia postępowania terapeutycznego, nabiera globalnego znaczenia.

## 1.1 CUKRZYCOWA CHOROBA NEREK

### 1.1.1 Definicja CChN

Wg definicji CChN będąca rodzajem przewlekłej choroby nerek jest utrzymującym się ponad 3 miesiące wywołanym przez cukrzycę uszkodzeniem nerek, określanym jako obecność strukturalnych lub czynnościowych nieprawidłowości nerek z prawidłową lub zmniejszoną filtracją kłębuszkową (GFR) [2,8]. Terminem tym zastąpiono dawniej używane pojęcie nefropatii cukrzycowej. W 2007 roku grupa robocza KDOQI (*ang. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*) przy NKF (*ang. National Kidney Foundation*), opracowała kryteria rozpoznania CChN [8]. Uznano, że u chorych na cukrzycę, CChN można rozpoznać jeśli:

- występuje makroalbuminuria (wskaźnik albuminowo-kreatyninowy ACR wynosi  $\geq 300$  mg/g), w co najmniej 2 spośród 3 oznaczeń wykonanych w okresie co najmniej 3 miesięcy);
- występuje mikroalbuminuria (ACR wynosi 30–300 mg/g w oznaczeniach i w okresie jak wyżej):
  - przy współistnieniu retinopatii cukrzycowej;
  - w cukrzycy typu 1 trwającej przynajmniej 10 lat

Rozpoznanie przewlekłej choroby nerek (PChN) oparto z kolei na następujących kryteriach:

- uszkodzenie nerek utrzymujące się  $\geq 3$  miesięcy, definiowane jako obecność strukturalnych lub czynnościowych nieprawidłowości nerek, z prawidłową lub zmniejszoną filtracją kłębuszkową (GFR - glomerular filtration rate),

co objawia się nieprawidłowościami morfologicznymi lub obecnością markerów uszkodzenia nerek, w tym nieprawidłowymi wynikami badań obrazowych.

- obniżenie GFR  $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  przez  $\geq 3$  miesiące z uszkodzeniem lub bez uszkodzenia nerek [9]

Za wczesny i czuły marker uszkodzenia nerek wg KDOQI uznano zwiększone wydalanie albumin z moczem wynoszące powyżej 30mg/dobę. Wartości mieszczące się w przedziale od 30 do 300mg/d określono jako mikroalbuminurię (MA), natomiast powyżej 300mg/d jako makroalbuminurię. Za normoalbuminurię uznano dobową utratę albumin poniżej 30mg [8]. Ze względu na powszechnie znane trudności z uzyskaniem wiarygodnej dobowej zbiórki moczu do oceny nasilenia albuminurii zalecono oznaczenie stosunku stężenia albumin do kreatyniny w moczu (ACR - albumin to creatinine ratio) [1, 2, 8, 9].

Utrzymującą się  $\geq 3$  miesiące mikroalbuminurię stwierdzaną w co najmniej 2 na 3 pomiarach ACR uznano za wskaźnik uszkodzenia nerek, umożliwiającą rozpoznanie PChN, a tym samym CChN, niezależnie od wartości GFR [8, 9].

Wg zaleceń KDOQI na podstawie wartości albuminurii i GFR można określić ryzyko rozwoju CChN [8]. Dane te umieszczono w tabeli nr 1.

**TABELA 1. PRAWDOPODOBIENSTWO WYSTĄPIENIA CChN W ZALEŻNOŚCI OD GFR I ALBUMINURII.**

GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	Etap PChN	Albuminuria		
		Normoalbuminuria	Mikroalbuminuria	Makroalbuminuria
> 60	1+2	r.r. CChN	m. CChN	CChN
30 – 60	3	m.p. CChN	m. CChN	CChN
< 30	4+5	m.p. CChN	m.p. CChN	CChN

r.r.-ryzyko rozwoju; m.p. – mało prawdopodobna; m – możliwa

### 1.1.2 Przebieg naturalny CChN

Historia naturalna zmian zachodzących w nerkach w przebiegu CT1 dzieli się na pięć etapów w zależności od stopnia zmian czynnościowych i morfologicznych [10,11]:

- etap 1: w początkowym okresie trwania cukrzycy zmiany w nerkach występują u 25-50% pacjentów. Są to: powiększenie nerek i wzrost GFR o 20 – 40% nazywane hiperfiltracją. Niektórzy autorzy uważają, że pierwszą zmianą,

wyprzedzając hiperfiltrację, uważaną za czynnik predysponujący do rozwoju CChN [12,13,14] jest powiększenie nerek [15]. MA może być już obecna.

- etap 2: w ciągu następnych 2-5 lat dochodzi do pogrubienia błony podstawnej kłębuszków nerkowych (GBM – *ang. glomerular basement membrane*) i rozplemu macierzy mezangium. MA jest wówczas obecna w okresach złej kontroli metabolicznej cukrzycy i podczas wysiłku fizycznego.
- etap 3: rozwija się zwykle po 7-10 latach od rozpoznania cukrzycy. MA pojawia się u około jednej trzeciej pacjentów. U dorosłych z CT1 obecność MA wskazuje na cztero- lub pięciokrotny wzrost ryzyka progresji do dalszych etapów CChN. W tym okresie wartości GFR mogą być prawidłowe lub nadal podwyższone. Histopatologicznie na etapie 3 stwierdza się progresję zmian w kłębuszkach nerkowych.
- etap 4: występuje zwykle u 15-20% pacjentów po 15-25 latach trwania cukrzycy [16,17]. Jego zwiastunem jest pojawienie się jawnego białkomoczu, co wiąże się także z obecnością innych pozanerkowych powikłań mikronaczyniowych, szczególnie retinopatii cukrzycowej.
- etap 5: ostatni, rozpoczyna się w chwili progresji do schyłkowej niewydolnością nerek (ESRD – *ang. end stage renal disease*). Zwykle występuje po 5-10 latach trwania jawnego białkomoczu.

Podział ten, wg niektórych uznany za historyczny, nie jest doskonały, ale w czytelny sposób wskazuje na postępujący charakter zmian w nerkach [18]. Z histopatologicznego punktu widzenia zasadniczą zmianą zachodzącą w nerkach w przebiegu cukrzycy jest gromadzenie macierzy pozakomórkowej, co prowadzi do poszerzenia regionów mezangium kłębuszka nerkowego oraz pogrubienia błony podstawnej kłębuszków i cewek nerkowych [19,20]. Z kolei z biochemicznego punktu widzenia hiperglikemia indukuje produkcję wolnych rodników tlenowych oraz zwiększa tworzenie końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (*ang. AGE – advanced glycation end-products*) i wzrost ekspresji receptora dla AGE w nerkach (*ang. RAGE – receptor of advanced glycation end-products*). Prowadzi także do aktywacji przemiany glukozy w szlaku poliowym, w wyniku którego, dochodzi do akumulacji alkoholi poliowych, w tym sorbitolu, obrzęku i uszkodzenia tkanek oraz zaburzeń regulacji pompy sodowo-potasowej [2,21].



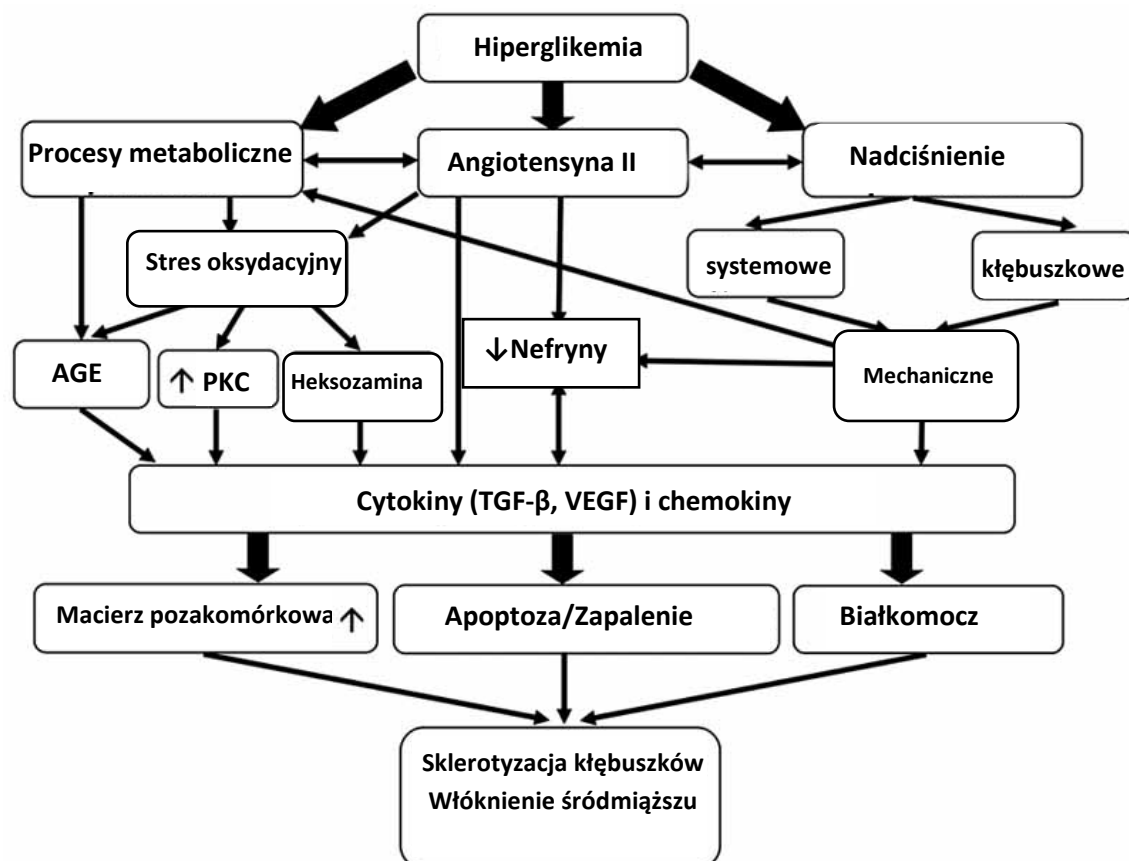
W komórkach mezangium hiperglikemia aktywuje kinazę białkową C (PKC – *ang. protein kinase C*), zwiększa aktywność diacylogliceroli i stężenie produktów lipooksygenazy [2,21]. Towarzyszy temu wzrost ekspresji w obrębie nerek licznych czynników wzrostowych i prozapalnych, które mogą mieć udział w zainicjowaniu zmian w nerkach. Należą do nich tlenek azotu (NO), prostanoidy, przedsionkowy czynnik natriuretyczny, a także glukagon czy hiperinsulinemia charakterystyczna głównie dla CT2 [22,23], jak również czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*VEGF- ang. vascular endothelial growth factor*) i transformujący czynnik wzrostu (*TGF- $\beta$  – ang. transforming growth factor- $\beta$* ) [24,25]. W cukrzycy obserwuje się również wzmożoną aktywację wewnątrznerkowego układu RAA (układ renina-angiotensyna-aldosteron) i związaną z tym nadprodukcję angiotensyny II (AngII), a także wzrost wskaźników stanu zapalnego: IL-6 i TNF $\alpha$  [26,27,28].

Mechanizm rozwoju CChN jest nadal tematem dyskusji. Na skutek oddziaływania wielu czynników może jednocześnie dochodzić do uszkodzenia śródbłonna naczyń, podocytów oraz cewek nerkowych prowadząc ostatecznie do ich zaniku, sklerotyzacji kłębuszków i włóknienia śródmiąższowego [28,29,30,31]. Na rycinie 1 przedstawiono możliwe mechanizmy uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy prowadzące do rozwoju schyłkowej niewydolności nerek (za Ziyadeh i Wolf [31]).

Jednakże pierwszym objawem świadczącym o rozpoczynającej się CChN i pojawiającym się w ciągu pierwszych kilku lata trwania cukrzycy, a także uważanym za wskaźnik rozwoju postępującej niewydolności nerek, jest wspomniana wcześniej hiperfiltracja [12,13,14,32,33,34]. Przyczyna i mechanizmy odpowiedzialne za powstanie tego zjawiska nie są ostatecznie poznane. W literaturze podawane są dwie hipotezy mogące tłumaczyć wystąpienie hiperfiltracji w przebiegu cukrzycy.

Pierwsza, tzw. naczyniowa, podaje za przyczynę hiperfiltracji zmiany w naczyniach nerkowych i wzrost aktywności czynników typu przedsionkowy peptyd natriuretyczny, układ RAA, stymulacja układu współczulnego, dysfunkcja kanałów wapniowych w tętnicze doprowadzającej kłębuszka, obecność sorbitolu czy samej hiperglikemii prowadzących do wzrostu przepływu krwi i wzrostu ciśnienia w kłębuszkach nerkowych [32,35,36].

Druga, tzw. cewkowa i wg większości autorów dominująca, zakłada, że przyczyną hiperfiltracji jest wzrost reabsorpcji sodu w cewce proksymalnej [32,33,34,37,38]. Wg tej hipotezy hiperglikemia prowadzi do wzrostu przesączania glukozy przez kłębuszki nerkowe,



**RYCINA 1. MECHANIZMY MOGĄCE PROWADZIĆ DO USZKODZENIA NEREK W PRZEBIEGU CUKRZYCY (ZA ZIYADEH I WOLF [31]).**

a następnie wzmożonej reabsorpcji glukozy w obrębie cewek proksymalnych poprzez syntetyzowane w zwiększonej ilości dwa transportery sodowo-glukozowe (*SGLT 1* i *SGLT 2* – ang. *sodium-glucose cotransporters*). Na skutek wzmożonej reabsorpcji glukozy dochodzi także do wzrostu reabsorpcji sodu i spadku jego stężenia w cewce dystalnej, jak również w moczu ostatecznym. Zmniejszone stężenie sodu w cewce dystalnej jest sygnałem dla komórek płamki gęstej aparatu przykłębuszkowego, wskutek czego dochodzi do inaktywacji cewkowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego (*TGF* – ang. *tubuloglomerular feedback*) i rozkurczu tętniczki doprowadzającej kłębuszka nerkowego. Rozkurcz ten prowadzi do wzrostu ciśnienia wewnątrz-kłębuszkowego i wystąpienia hiperfiltracji. Okazuje się jednak, że mechanizm *TGF* nie jest konieczny do wzrostu ciśnienia filtracyjnego [34]. Na modelu mysim, wykazano, że pomimo zablokowania działania *TGF* poprzez inaktywację receptora *A1* dla adenozyiny, zwierzęta z indukowaną cukrzycą nadal rozwijają hiperfiltrację. Autorzy zjawisko to wyjaśniają spadkiem ciśnienia wewnątrz światła cewki proksymalnej (wskutek zmniejszonego stężenia sodu), co jest równoznaczne

ze spadkiem ciśnienia w torebce Bowmana. To z kolei prowadzi do wzrostu gradientu ciśnienia w obrębie bariery filtracyjnej prowadząc do hiperfiltracji, wg wzoru:

$$\Delta p = P_{nk} - P_{prox} - (\pi_{nk} + \pi_{Bow})$$

gdzie:

$\Delta p$  - ciśnienie filtracyjne

$P_{nk}$  - ciśnienie hydrostatyczne w naczyniach kłębuszka nerkowego

$P_{prox}$  - ciśnienie hydrostatyczne w cewce proksymalnej lub torebce Bowmana

$\pi_{nk}$  - ciśnienie koloidowo-osmotyczne w naczyniach kłębuszka nerkowego

$\pi_{Bow}$  - ciśnienie koloidowo-osmotyczne w torebce Bowmana

W obu sytuacjach, zarówno przy współdziałaniu jak i braku TGF, konieczne są zmiany w obrębie cewek proksymalnych zachodzące w środowisku cukrzycowym i prowadzące do nadmiernej reabsorpcji glukozy i sodu.

Zjawisko to jest prawdopodobnie kluczowe do rozwoju hiperfiltracji i dominujące na wczesnym etapie rozwoju CChN. Należy jednak pamiętać, że jednocześnie może dochodzić do wielu innych procesów spowodowanych przez hiperglikemię, jak np. uszkodzenie śródbłonna naczyń, podocytów, czy aktywacja układu RAA. Który z tych procesów jest ważniejszy dla ostatecznego rozwoju niewydolności nerek pozostaje nadal dyskusyjny. Znalezienie wczesnych markerów uszkodzenia nerek mogłoby pozwolić na dalsze poznanie mechanizmów rozwoju CChN.

## 1.2 CZYNNIKI RYZYKA ROZWOJU CChN

Do czynników ryzyka rozwoju CChN należy: nieprawidłowa kontrola glikemii, czas trwania cukrzycy, okres dojrzewania, wiek w chwili zachorowania, występowanie powikłań cukrzycy u członków rodziny, hiperlipidemia oraz nadciśnienie tętnicze (NT) [7].

### 1.2.1 Kontrola glikemii

Przeprowadzone w latach dziewięćdziesiątych badania jednoznacznie wskazały, że ryzyko rozwoju i progresji powikłań CT1 jest ściśle związane z nieprawidłową kontrolą

glikemii. Stwierdzono, że stosowanie intensywnej insulinoterapii za pomocą wielokrotnych wstrzyknięć lub przy użyciu stałego podskórnego wlewu insuliny (*ang. CSII-continuous subcutaneous insulin infusion*), zmniejsza ryzyko wystąpienia MA o 55% w porównaniu do konwencjonalnej terapii [38,39]. Pacjenci leczeni intensywniej wykazywali również o 2% niższe stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA1c), a po zakończeniu badania, pomimo powrotu do wyższych wartości HbA1c rzadziej stwierdzano u nich występowanie MA i innych powikłań w porównaniu do grupy leczonej wyłącznie metodą konwencjonalnej insulinoterapii [40]. Wysłano wniosek, że każda poprawa kontroli glikemii związana jest ze zmniejszeniem ryzyka rozwoju powikłań [41]. Wykazano, że próg HbA1c, przy którym może pojawiać się MA, wynosi 8,1% [42].

Istnieje kilka metod oceny wyrównania metabolicznego cukrzycy. Jedną z nich jest prowadzenie samokontroli glikemii poprzez codzienne oznaczanie stężenia glukozy we krwi, co dostarcza natychmiastowej informacji o stanie glikemii i umożliwia realizację optymalnego leczenia [43]. Kolejną metodą jest oznaczenie we krwi HbA1c, która powstaje poprzez przyłączenie cząsteczek glukozy do hemoglobiny podczas cyklu życiowego krwinek czerwonych. HbA1c odzwierciedla wartość glikemii w okresie od 4 do 12 tygodni poprzedzającym oznaczenie, przy czym ok. 60% obecnej we krwi HbA1c powstaje w ciągu ostatniego miesiąca przed wykonaniem badania [43,44]. Oznaczenie HbA1c uznano za najbardziej użyteczną metodę oceny kontroli metabolicznej cukrzycy oraz oceny ryzyka rozwoju powikłań mikro- i makronaczyniowych [45,46]. Wg zaleceń Międzynarodowego Stowarzyszenia ds Cukrzycy u Dzieci i Młodzieży (ISPAD *ang. International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*) o optymalnej kontroli cukrzycy u dzieci świadczy utrzymanie stężenia HbA1c poniżej 7,5%. Wartości HbA1c pomiędzy 7,5 a 8%, uznano za suboptymalne wyrównanie metaboliczne, natomiast powyżej 9% świadczące o zwiększonym ryzyku wystąpienia powikłań [43]. Wartości te zestawiono w tabeli 2.

**TABELA 2. RODZAJE WYRÓWNANIA METABOLICZNEGO CUKRZYCY W ZALEŻNOŚCI OD STĘŻENIA HbA1c WG ZALECEŃ ISPAD**

<b>Wyrównanie metaboliczne</b>	<b>Idealne</b>	<b>Optymalne</b>	<b>Suboptymalne</b>	<b>Złe</b>
HbA1c (%)	<6,05	<7,5	7,5-9,0	>9,0

Polskie Towarzystwo Diabetologiczne w 2011 przyjęło bardziej restrykcyjne kryteria i za zalecane kryterium wyrównania cukrzycy u dzieci i młodzieży uznało stężenie  $HbA1c \leq 6,5\%$  [44].

### **1.2.2 Czas trwania cukrzycy i wpływ okresu dojrzewania**

Czas trwania cukrzycy obok hiperglikemii jest kolejnym istotnym czynnikiem rozwoju CChN [47]. Jednakże w tym zakresie zdania naukowców są podzielone. Niektórzy autorzy stwierdzili dodatnią zależność pomiędzy nasileniem albuminurii a czasem trwania CT1 [47,48,49], inni – jej brak [50]. Oszacowanie MA w przebiegu cukrzycy u dzieci jest dodatkowo utrudnione ze względu na wpływ okresu dojrzewania. Istnieje wiele doniesień wskazujących na to, że MA rzadko występuje przed okresem dojrzewania bez względu na czas trwania cukrzycy [51,52]. Mogłoby to oznaczać, że CT1 występująca przed okresem dojrzewania nie zwiększa ryzyka powikłań. Pomimo sprzeczności w wynikach wielu badań, stwierdzono ostatecznie, że długość trwania cukrzycy również przed okresem dojrzewania zwiększa ryzyko pojawienia się MA, a młodszy wiek w chwili zachorowania i dłuższy okres przed wystąpieniem pokwitania, może opóźnić wystąpienie MA, a następnie ESRD [53,54].

### **1.2.3 Występowanie powikłań cukrzycy u członków rodziny**

Czynniki genetyczne mają niewątpliwy wpływ na rozwój CChN i określają indywidualne predyspozycje do rozwoju CChN [55,56]. U części pacjentów, zarówno z CT1 jak i CT2, dochodzi do rozwoju CChN niezależnie od wyrównania metabolicznego cukrzycy [55,57]. Badania genetyczne ujawniły związek pomiędzy ryzykiem rozwoju CChN a występowaniem genów-kandydatów rozwoju CChN [55,57] oraz polimorfizmem genu (I/D – insercja/delecja) dla konwertazy angiotensyny (ACE). Pacjenci o genotypie DD wykazujący najwyższe wartości ACE cechowali się najwyższą predyspozycją do rozwoju i progresji CChN i zmniejszonego renoprotekcyjnego wpływu inhibitorów konwertazy angiotensyny [58,59].

### **1.2.4 Nadciśnienie tętnicze**

Badania prowadzone wśród dorosłych pacjentów wykazały, że wyższe wartości ciśnienia tętniczego nawet w obrębie prawidłowego zakresu, mogą zwiększać ryzyko rozwoju CChN [60,61]. Wzrost ciśnienia tętniczego jest związany ze wzrostem albuminurii zarówno u dzieci jak i u dorosłych [62], a brak spadku ciśnienia tętniczego w nocy oceniony na podstawie całodobowego ambulatoryjnego pomiaru ciśnienia tętniczego (ABPM) może wyprzedzać wystąpienie MA [63].

### **1.2.5 Hiperlipidemia**

Hiperlipidemia jest częstą nieprawidłowością obserwowaną u osób chorujących na cukrzycę [7]. Wysokie stężenia cholesterolu i triacylogliceroli mogą zwiększać ryzyko rozwoju utrwalonej MA i CChN [64], niskie natomiast są związane z regresją MA [65].

### **1.2.6 Zalecenia dotyczące profilaktycznych badań w kierunku CChN**

Wytyczne KDOQI obowiązujące od 2007 roku przewidują profilaktyczną coroczną ocenę albuminurii u pacjentów z CT1 po 5 latach trwania choroby, natomiast u pacjentów z CT2 - w chwili rozpoznania oraz dodatkowo oznaczenie stężenia kreatyniny w surowicy i obliczenia GFR [8]. Podwyższone wydalanie albumin w przypadku braku zakażenia układu moczowego wymaga potwierdzenia w dwóch dodatkowych badaniach moczu wykonanych w okresie od 3 do 6 miesięcy. Z kolei ISPAD zaleciło w 2007 roku, a następnie potwierdziło w 2009, konieczność corocznej kontroli MA u dzieci od 9r.ż. z cukrzycą trwającą 5 lat oraz od 11r.ż. po upływie 2 lat trwania cukrzycy [66,67]. Zarówno KDOQI jak i ISPAD zaleca oznaczenie wskaźnika albuminowo-kreatyninowego w porcji moczu, jako metodę skринingową w rozpoznawaniu MA. Obie organizacje uznają te same wartości referencyjne ACR.

## **1.3 DOTYCHCZASOWE MARKERY OCENY USZKODZENIA NEREK**

### **1.3.1 Mikroalbuminuria**

Głównym składnikiem białek wydalanych z moczem są albuminy [2,68]. Do moczu przedostają się z krwi, gdzie występują w różnych modyfikacjach chemicznych, różnej strukturze globularnej, wykazują funkcję onkotyczną, transportową i antyoksydacyjną [69]. W prawidłowym moczu ostatecznym albuminy stanowią ok. 15% białek, dalsze ok. 10% to inne białka osocza, a ponad 50% pozostałych, różnych białek, nie pochodzi z osocza [2]. W niektórych stanach patologicznych, albuminy mogą stanowić nawet 100% białek moczu [2]. Albuminuria wykazuje dużą zmienność i może przybierać różne wartości. Czynniki mogącymi ją zwiększać są: gorączka, intensywne ćwiczenia fizyczne, niewydolność serca, nadciśnienie tętnicze, znaczna hiperglikemia, krwimocz i zakażenie dróg moczowych [2,8,70].

Wydalanie albumin z moczem wykazuje również rytm dobowy, a mianowicie ulega zmniejszeniu w nocy. U pacjentów z CT1 różnica ta jest znacząca i może odzwierciedlać większą przepuszczalność błony podstawnej kłębuszków i większe wahania glikemii [70].

W związku ze zmiennością wydalania albumin z moczem precyzyjne jej określenie jest trudne. Istnieje kilka metod, do których należy m.in. oznaczenie zawartości albumin w dobowej zbiorce moczu [71]. Wadą tej metody jest konieczność wykonania dokładnej zbiórki moczu oraz wspomniana wcześniej dobowo zmienność wydalania albumin. Metodą pozwalającą uniknąć wpływu tych dwóch czynników jest oznaczenie albuminurii w pierwszej rannej próbce moczu i określenie w niej wskaźnika albuminowo - kreatyninowego (*ang.* - *ACR: albumin – creatinine ratio*), poprzez obliczenie stosunku stężenia albuminy do kreatyniny [8,70]. Inne metody to: oznaczenie albuminurii w moczu pobranym w odpowiednim przedziale czasowym i określenie jej jako wydalania minutowego. Ze względu na wiele technik zbiórki moczu zostały zdefiniowane odpowiednie zakresy referencyjne, które przedstawiono w tabeli 1 (wg zaleceń KDOQI) [8].

**TABELA 3. DEFINICJE ALBUMINURII I PROTEINURII W ZALEŻNOŚCI OD METODY OZNACZANIA (WG ZALECEŃ KDOQI).**

Rodzaj albuminurii	Ranna próbka moczu ACR (mg/g)	24-godzinna zbiórka moczu (mg/24h)	Wydalenie minutowe (µg/min)
Normoalbuminuria	<30	<30	<20
Mikroalbuminuria	30-300	30-300	20-200
Makroalbuminuria	>300	>300	>200

**ACR: wskaźnik albuminowo-kreatyninowy**

Z uwagi na zmienność w wydalaniu albumin wprowadzono termin utrwalonej MA, za którą uznano stwierdzenie MA w dwóch na trzech oznaczeniach wykonanych w ciągu od 3 do 6 miesięcy [8].

W cukrzycy MA uważana jest za najwcześniejszy objaw uszkodzenia nerek, stąd w celu stosowania właściwej profilaktyki i leczenia, poznanie patomechanizmu MA ma kluczowe znaczenie.

### 1.3.1.1 Patomechanizm mikroalbuminurii

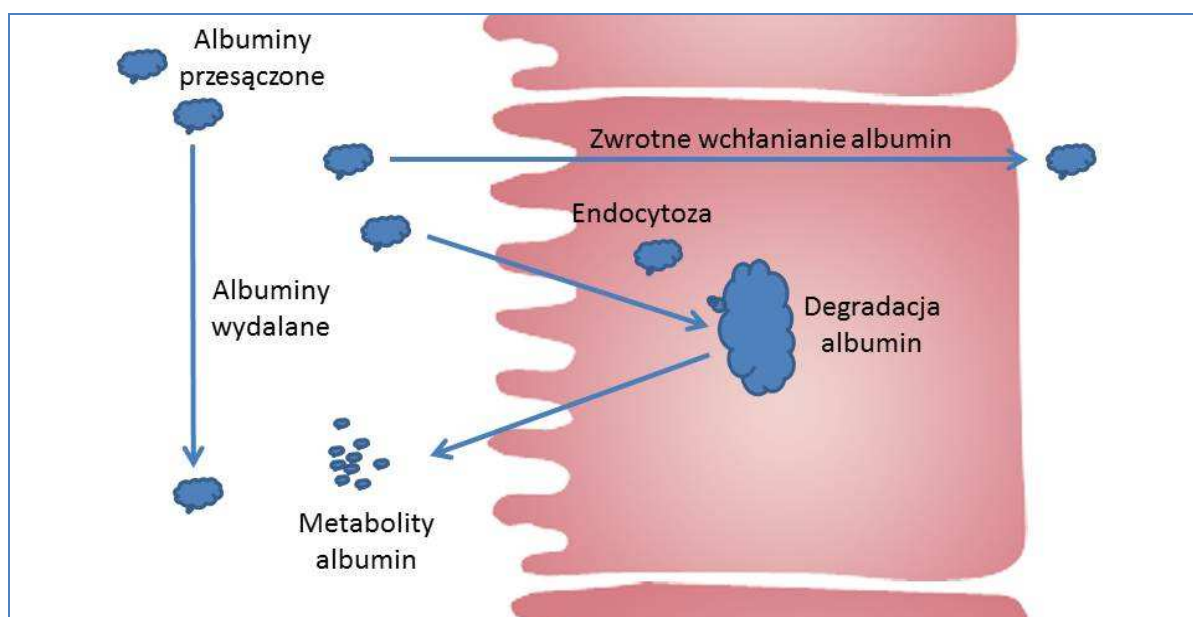
Wczesną zmianą rozwijającą się w przebiegu cukrzycy jest hipertrofia nerek [15,70,72] oraz hiperfiltracja [12,13,14]. Na skutek hiperglikemii może dochodzić do przerostu nerek, wzrostu zawartości łańcuchów  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  w mezangium, a w błonie podstawnej do wzrostu zawartości łańcuchów  $\alpha 3$  i  $\alpha 4$  kolagenu typu IV oraz zmniejszenia zawartości ujemnie naładowanych proteoglikanów, prowadząc do spadku selektywności bariery filtracyjnej [73]. Na skutek hiperfiltracji poprzez zwiększone ciśnienie wewnątrzkiłbuszkowe dochodzi do wzrostu przesączania albumin.

Nie jest to jednak jedyna przyczyna wystąpienia białkomoczu u chorych na cukrzycę. Jak wykazują badania naukowe, mogą tu odgrywać rolę także zmiany w obrębie poszczególnych struktur nerek, np. w obrębie podocytów. Wykazano, że zmniejszenie ich liczby u chorych na cukrzycę jest związane z nasileniem albuminurii [74,75,76], a obecność w moczu nefryny pochodzącej z uszkodzonych podocytów u chorych z CT1 i normoalbuminurią oraz zmniejszenie jej zawartości w biopsji nerki może potwierdzać uszkodzenie tego elementu błony filtracyjnej [77,78]. Także uszkodzenie śródbłonna naczyń nerkowych i związany z tym wzrost markerów tego procesu, jak np. czynnika von Willebranda, cząsteczek adhezyjnych komórek śródbłonna (sVCAM-1) i E-selektyny obserwowany u chorych z CT2 są związane ze wzrostem białkomoczu [79]. Wykazano również, że dysfunkcja śródbłonna może być spowodowana przewlekłym procesem zapalnym toczącym się u chorych na cukrzycę, u których zauważono zwiększone stężenie w osoczu markerów procesu zapalnego, takich jak CRP, IL-6 i TNF- $\alpha$  [80] oraz dodatnią zależność pomiędzy wartościami wskaźników zapalenia i markerów dysfunkcji śródbłonna (sVCAM-1, E-selektyna) [81].

Inni autorzy z kolei za pierwotną przyczynę białkomoczu w cukrzycy uznają zmiany zachodzące w cewkach nerkowych. Albuminuria miałaby nie być efektem wzrostu filtracji kiłbuszkowej czy zmian morfologicznych kiłbuszka nerkowego, a raczej wynikiem zaburzeń degradacji albumin w obrębie cewki proksymalnej [82,83,84,85]. Wg tych autorów, degradacja ta powinna odbywać się w dwojaki sposób:

- na drodze cewkowej reabsorpcji (>95% filtrowanych albumin)
- poprzez endocytozę i degradację niezreabsorbowanych albumin wewnątrz lizosomów w komórce cewki nerkowej (ryc. 2).





**RYCINA 2. PROPONOWANY PATOMECHANIZM DEGRADACJI ALBUMIN W KOMÓRCE CEWKI PROKSYMALNEJ NEFRONU [82].**

Czynnikami, które hamują degradację albumin w komórkach cewek nerkowych są TGF- $\beta$ 1 i AngII. Ich aktywność wzrasta u chorych na cukrzycę i związana jest z nasileniem hiperglikemii. TGF- $\beta$  wykazuje hamujący wpływ na enzymy lizosomalne, a w szczególności na proteiny cysteiny, które są odpowiedzialne za degradację białek wewnątrz komórek cewkowych [86]. Zwolennicy tej teorii poddają w wątpliwość istnienie zależnej od ładunku selektywności bariery filtracyjnej, która wg nich regulowana jest raczej wielkością cząstek [82]. Można więc stwierdzić, że patomechanizm MA w przebiegu cukrzycy jest złożonym zagadnieniem i nadal brakuje jednoznacznej teorii mogącej ostatecznie wyjaśnić pochodzenie białkomoczu.

### 1.3.1.2 Mikroalbuminuria u dzieci i wpływ okresu dojrzewania na nasilenie MA

Określenie występowania MA w okresie dzieciństwa jest utrudnione przez wpływ okresu dojrzewania. W wielu badaniach, wykazano, że MA rzadko występuje przed okresem dojrzewania, nawet u chorych na cukrzycę z długim okresem jej trwania [87]. Jednakże czas trwania cukrzycy przed okresem dojrzewania zwiększa ryzyko wystąpienia MA [88,89]. Z drugiej strony młodszy wiek w chwili zachorowania oraz dłuższy przedpokwitaniowy okres trwania cukrzycy, wydaje się opóźniać rozwój MA [90,91] a nawet ESRD [92]. Okres dojrzewania wykazuje niekorzystny wpływ na powstanie powikłań mikronaczyniowych i czynniki obecne w okresie dojrzewania mogą przyspieszyć zarówno wystąpienie MA jak i jej progresję, zwiększając 3 – 4 krotnie wzrost ryzyka MA [88,93,94]. Czynniki te nie są

do końca poznane. Wiadomo, że w okresie dojrzewania dochodzi do zmniejszenia przestrzegania kontroli cukrzycy, zwiększenia ciśnienia tętniczego, aktywacji osi pomiędzy hormonem wzrostu (GH) a insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF-1) oraz wzrostu hormonów płciowych, które mogą nasilać negatywne skutki hiperglikemii i zwiększać insulinooporność [95,96,97].

### 1.3.2 Ocena przesączania kłębuszkowego

Ocena przesączania kłębuszkowego (GFR) jest ważnym parametrem informującym o funkcji nerek. Wskaźnik ten oznacza ilość osocza przefiltrowanego w jednostce czasu przez kłębuszki nerkowe do moczu pierwotnego. Wynik podawany jest w ml/min lub ml/min/1,73m<sup>2</sup>, czyli po przeliczeniu na standardową powierzchnię ciała. Za normę uznano wartość GFR ≥ 90ml/min/1,73m<sup>2</sup>, która przy jednoczesnym braku nieprawidłowości ocenianych na podstawie analizy moczu i badań obrazowych, wskazuje na brak uszkodzenia nerek. Pacjenci o GFR ≥ 90ml/min/1,73m<sup>2</sup> i wykazujący, np. mikroalbuminurię zaliczani są do chorych z pierwszym etapem PChN. Interpretację wyniku GFR u dzieci i dorosłych przedstawia tabela 5 [8,9].

**TABELA 4. INTERPRETACJA WYNIKU GFR**

<b>Etap PChN</b>	<b>Wynik GFR (ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	<b>Uszkodzenie nerek</b>
1	≥ 90	z prawidłowym lub podwyższonym GFR
2	60 – 89	z łagodnym obniżeniem GFR
3	30 – 59	ze średnim obniżeniem GFR
4	15 – 29	ze znacznym obniżeniem GFR
5	< 15 (lub dializoterapia)	niewydolność nerek

Wynik GFR ma wartość szacunkową, stąd do jego oceny istnieje kilka metod, z których najbardziej popularna pozostaje metoda oparta na stężeniu kreatyniny w surowicy. Kreatynina jest cząsteczką o małej masie wynoszącej 113D, powstającą w mięśniach na drodze nieenzymatycznej konwersji z kreatyny i fosfokreatyny. Do oceny GFR za pomocą kreatyniny służy kilka wzorów [9,98,99,100], spośród których u dzieci najczęściej używana jest formuła Schwartza uwzględniająca również zależne od okresu dojrzewania takie parametry jak wzrost czy płeć (tabela 5).

TABELA 5. WZÓR SCHWARTZA SŁUŻĄCY DO OCENY GFR (ML/MIN/1,73M<sup>2</sup>) U DZIECI

$$GFR = k * \frac{\text{wzrost (cm)}}{sKreat \left(\frac{mg}{dl}\right)}$$

**k:** współczynnik k; **sKreat:** stężenie kreatyniny we krwi

Wartość współczynnika k obecnego we wzorze Schwartz'a do niedawna zmienna i zależna od wieku i płci pacjenta, wg aktualnych zaleceń [101] przyjmuje wartość stałą, wynoszącą 0,413.

Ocenę GFR można również przeprowadzić na podstawie wartości klirensu kreatyniny, która wg KDOQI nie przewyższa swoją wartością oceny GFR metodą Schwartz'a. Jednakże do wykonania tego pomiaru konieczne jest wykonanie dobowej zbiórki moczu i ze względu na powszechnie znane trudności z uzyskaniem wiarygodnej 24-godzinnej zbiórki moczu zwłaszcza u dzieci, wyznaczenie klirensu kreatyniny może być obarczone dużym błędem, stąd nie użyto tej metody w niniejszym badaniu.

Metody oceny GRF na podstawie kreatyniny są od lat szeroko stosowane w praktyce klinicznej, również z powodu stosunkowo niskiego kosztu oznaczenia kreatyniny. Jednak ocena GFR przy pomocy tego wskaźnika może być obarczona dużym błędem. Stężenie kreatyniny we krwi ulega wahaniom z powodu wielu pozanerkowych czynników, np wieku, płci, rasy, masy mięśniowej, stanu odżywienia, infekcji czy wzmoczonego wysiłku fizycznego oraz diety, czy też z powodu przyjmowania leków typu trimetoprim, cymetydyna i salicylany [102,103]. Także stężenie glukozy, kwasu moczowego, bilirubiny czy obecność furosemidu i cefalosporyn w surowicy może mieć wpływ na przebieg reakcji Jaffego – klasycznej metody kolorymetrycznej służącej do pomiaru kreatyniny [104].

W związku z tym, jako nowy marker służący do oceny GFR już w 1979 roku, zaproponowano użycie stężenia cystatyny C (CystC). Zaobserwowano, że osoczowe stężenie CystC było 13 – krotnie wyższe u pacjentów leczonych za pomocą hemodializ niż u zdrowych osób [105]. CystC jest białkiem o niskiej, wynoszącej 13 kD masie cząsteczkowej produkowanym przez komórki jądrowe. Jest całkowicie filtrowana przez kłębuszki nerkowe, a następnie reabsorbowana i degradowana przez cewki proksymalne [106,107,108]. CystC jest najsilniejszym inhibitorem proteaz cysteiny takich jak katepsyna K oraz H i w przeciwieństwie do innych cystatyn obecna jest w znacznym stężeniu we wszystkich płynach ludzkiego organizmu [109]. W wielu badaniach wykazano, że CystC

w porównaniu do kreatyniny jest bardziej czułym markerem do obliczania GFR zwłaszcza dla oceny jego redukcji w przedziale 60-79ml/min/1,73m<sup>2</sup> [110,111].

CystC uznano za obiecujący marker zarówno ostrego jak i przewlekłego uszkodzenia nerek również u dzieci, przewyższający swoją dokładnością kreatyninę [112,113]. W badaniu prowadzonym w Oddziale Intensywnej Opieki Medycznej wykazano, że u pacjentów, u których doszło do rozwoju AKI wzrost CystC wyprzedzał o 1 – 2 dni wzrost kreatyniny [114,115].

Także u osób chorujących z powodu cukrzycy wykazano, że CystC dokładniej ocenia funkcję nerek niż kreatynina [116,117]. W badaniu porównującym wartości GFR uzyskane na podstawie CystC, kreatyniny i przy użyciu znacznika izotopowego (iGFR), czyli metody najlepiej odzwierciedlającej funkcję nerek, stwierdzono, że ocena przesączania kłębuszkowego na podstawie stężenia kreatyniny znacząco niedoszacowywała filtrację kłębuszkową w porównaniu do iGFR. Nie stwierdzono natomiast różnic pomiędzy zmianami iGFR a GFR ocenionym na podstawie stężenia cystatyny C, wskazując na lepsze właściwości tego markera do oceny przesączania kłębuszkowego w porównaniu do kreatyniny [117]. Niektórzy autorzy są wręcz zdania, że CystC powinna zastąpić kreatyninę do oceny GFR u dzieci [113].

Wśród wzorów służących do obliczania GFR za pomocą CystC najczęściej używanym jest wzór Fillera, którego formuła przedstawia się następująco [113].

W związku z licznymi doniesieniami naukowymi wykazującymi lepsze właściwości CystC do obliczania GFR również u dzieci, a także u osób chorujących z powodu cukrzycy, w niniejszym opracowaniu do analizy porównawczej i oceny zależności pomiędzy oznaczanymi parametrami w obrębie grupy badanej i kontrolnej wybrano CystC.

## 1.4 MARKERY WCZESNEGO USZKODZENIA NEREK

### 1.4.1 Lipokaina obojętnochłonna związana z żelatynazą (NGAL-neutrophil gelatinase-associated lipocalin)

NGAL – ludzka obojętnochłonna lipokaina związana z żelatynazą jest białkiem złożonym ze 178 aminokwasów o masie cząsteczkowej 25-kDa należącym do rodziny lipokalin [118,119,120]. Jej ekspresja jest zaznaczona w komórkach układu immunologicznego, hepatocytach i komórkach cewek nerkowych. Niewielka, stała ekspresja genu dla NGAL zachodzi również w narządach, takich jak: macica, prostata, gruczoł ślinowy, płuco, tchawica, żołądek, jelito grube [121,122]. NGAL pośredniczy w odpowiedzi immunologicznej, bierze udział w apoptozie komórek oraz nefrogenzie poprzez stymulowanie różnicowania komórek mezenchymalnych w kierunku nabłonka cewek nerkowych [119]. Synteza NGAL może znacząco wzrastać w uszkodzonych komórkach nabłonka, np. w procesach zapalnych i nowotworowych jak również w stanach ostrego niedokrwienia [122,123,124]. Wydalana jest jako białko odporne na działanie proteaz i może być wykrywana w moczu [125].

W obrębie nerek wzmożona ekspresja genu dla NGAL została wykryta w dystalnej części nefronu, zwłaszcza w ramieniu wstępującym pętli Henlego i cewkach zbiorczych w przebiegu ostrego uszkodzenia nerek w mechanizmie niedokrwienie–reperfuzja [124]. Wzrost produkcji NGAL ma na celu ochronę funkcji nerek, zmniejszenie apoptozy i nasilenie regeneracji uszkodzonych komórek [126,127] oraz może odgrywać rolę w utrzymaniu odpowiedniej struktury nabłonków [128]. Na skutek syntezy NGAL w dystalnej części nefronu, lipokalina ta zostaje wydzielona do moczu i stanowi główną frakcję NGAL w moczu ostatecznym. NGAL może również przenikać do moczu z krwi na drodze filtracji kłębuszkowej. Jednak w zdrowych nerkach dochodzi do niemal całkowitej reabsorpcji NGAL w cewce bliższej. Każde zmniejszenie GFR może obniżyć klirens nerkowy NGAL, co w konsekwencji może doprowadzić do kumulacji NGAL we krwi obwodowej u pacjentów z PChN [129].

Obecność NGAL w moczu może więc wynikać przesączania kłębuszkowego, z braku wchłaniania zwrotnego NGAL w cewce proksymalnej albo ze wzmożonej syntezy NGAL w cewce dystalnej. Istnieją liczne doniesienia na temat wzrostu NGAL zarówno w surowicy i w moczu w przebiegu różnych stanów chorobowych. Dowiedziono, że wzrasta ono w stanach ostrego uszkodzenia nerek spowodowanego niedokrwieniem [126], szczególnie

po zabiegach kardiochirurgicznych [130] lub po transplantacji nerek [131,132], jak również w przebiegu sepsy [133], u dzieci po wszczepieniu pomostów naczyniowych kardio-pulmonologicznych [134] i już po 2 godzinach od podania kontrastu radiologicznego [135]. Zmiany w stężeniach NGAL obserwowano również w przebiegu przewlekłych chorób nerek. Wykazano, że NGAL w moczu odzwierciedla aktywność nefropatii toczniowej [136] oraz wykazuje zależność z ciężkością przebiegu autosomalnej dominującej torbielowatości nerek [137]. Zaobserwowano również, że NGAL w surowicy jak i w moczu również wzrasta w przebiegu licznych glomerulopatii, np. w ogniskowym stwardnieniu kłębuszków nerkowych, nefropatii błoniastej, czy nefropatii IgA, przy czym wzrost NGAL w surowicy towarzyszył pojawieniu się PChN w przebiegu wymienionych glomerulopatii, a wzrost NGAL w moczu wykazywał dodatnią zależność z nasileniem białkomoczu [138,139].

Również w przebiegu CT2 stwierdzono zmiany w wartościach NGAL. Wśród 56 dorosłych chorujących z powodu CT2 i należących do trzech grup wykazujących odpowiednio normo- i mikroalbuminurię oraz CChN wykazano, że NGAL w surowicy i moczu wzrasta w porównaniu do grupy kontrolnej we wszystkich trzech grupach, przy czym największy wzrost obserwowano u pacjentów z CChN [140]. Badacze Ci wysunęli wniosek, że NGAL może odgrywać ważną rolę w patofizjologii adaptacji nerek do cukrzycy, prawdopodobnie jako mechanizm obronny mający na celu łagodzenie uszkodzeń w obrębie cewek nerkowych.

W badaniach eksperymentalnych prowadzonych na modelach mysich CChN, również wykazano znaczący wzrost NGAL w moczu oraz jego dodatnią zależność z albuminurią [141]. Za przyczynę wzrostu NGAL podano dysfunkcję cewki proksymalnej i brak zwrotnej reabsorpcji NGAL [141]. Badanie to potwierdziło, że NGAL może być użytecznym narzędziem do monitorowania przebiegu chorób nerek oraz ich leczenia w przypadku zmian zlokalizowanych zarówno w obrębie kłębuszków nerkowych, cewek proksymalnych oraz dystalnych.

#### **1.4.2 Białko wiążące retinol (RBP – retinol binding protein)**

Białko wiążące retinol (RBP) jest 21- kDa białkiem syntetyzowanym w wątrobie i odpowiedzialnym za transport witaminy A z wątroby do innych tkanek. Jest swobodnie przesączone przez kłębuszki, a następnie resorbowane i metabolizowane w komórkach cewek proksymalnych [123]. Wzrost stężenia RBP w moczu (uRBP) może wynikać z zaburzeń

funkcji cewki proksymalnej jak i nasycenia reabsorpcji cewkowej [142]. Stężenie RBP w osoczu może ulec zmniejszeniu w niedoborze Wit. A i w tych przypadkach wartość uRBP może być fałszywie ujemna [143].

Analizując wyniki pacjentów z ostrym uszkodzeniem nerek o różnej etiologii stwierdzono, że RBP jest czułym wskaźnikiem dysfunkcji cewek, wyprzedzającym wzrost innych markerów uszkodzenia cewek, np. N-acetyl-beta-D-glucosaminidazy (NAG) w moczu [144]. Wykazano również, że zwiększone stężenie uRBP było wczesnym markerem uszkodzenia nerek po stosowaniu cysplatyny, ołowiu, rtęci, kadmu czy cyklosporyny [145].

Zmiany w stężeniu uRBP zaobserwowano również u pacjentów chorujących z powodu CT1. U 20 dzieci chorujących ponad 5lat i niewykazujących cech CChN, stwierdzono statystycznie istotny wzrost uRBP w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto stężenie uRBP wykazywało dodatnią korelację z czasem trwania CT1 oraz stężeniem HbA1c [142].

### 1.4.3 Katepsyna L

Katepsyna jest rodzajem białka enzymatycznego należącego do grupy lizosomalnych proteaz cysteiny i odpowiedzialna jest za wewnątrzkomórkową degradację białek. Jest wiele typów katepsyn, np. katepsyna B, L, H, S, K, F, V, X, W, O lub C. Mogą one brać udział w metabolizmie białek, aktywacji prohormonów, prezentacji antygeny, przebudowie kości i apoptozie [146,147]. W warunkach fizjologicznych istnieje stała, niewielka zawartość katepsyny w moczu (uKatep) [19]. Do wzrostu produkcji katepsyn dochodzi u chorych z nowotworami piersi, płuc, mózgu, jelit, czerniakiem czy rakiem pęcherza moczowego [147,148,149], a także w reumatoidalnym zapaleniu stawów [147]. Również w chorobach nerek np. w błoniastym kłębuszkowym zapaleniu nerek stwierdzono wzrost stężenia katepsyny w moczu [150]. Czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost stężenia uKatep jest przeładowanie cewkowej reabsorpcji białek lub uszkodzenie cewek nerkowych [151]. Wzrost stężenia katepsyny w moczu wykazano na modelu zwierzęcym po subtotalnej nefrektomii, jak również w przebiegu cukrzycy. Aktywność tego enzymu w obrębie cewek nerkowych była zahamowana tylko w przypadku jednostronnej nefrektomii oraz cukrzycy. Proces ten tłumaczono poważnym uszkodzeniem cewek nerkowych, w skutek czego mogłoby dochodzić do spadku aktywności enzymu w cewkach, wzrostu wydzielania go do moczu i spadku reabsorpcji białek w obrębie cewek. W przypadku cukrzycy zjawisko to sugerowałoby obecność dysfunkcji cewek pierwotnie w stosunku do uszkodzenia kłębuszków [151]. Wzrost

uKatep u chorych na CT2 zarówno w przypadku normo-, mikro- jak i makroalbuminurii wykazali również inni badacze [152]. Jednak zauważono także, że w przypadku cukrzycy w skutek działania TNF- $\beta$  [86] dochodzi do hamowania aktywności katepsyn, a następnie spadku degradacji białek w komórkach cewek proksymalnych i wystąpienia MA, a stopień hamowania katepsyn był z kolei związany z nasileniem albuminurii [153].

Katepsynę L zidentyfikowano również w obrębie podocytów, jako enzym wpływający na strukturę białek budujących błonę filtracyjną, a mianowicie dynaminy i synaptopodiny [154], a wzrost tej substancji wykryto w obrębie podocytów u pacjentów z nefropatią cukrzycową oraz w kłębuszkowych chorobach nerek, w tym w ogniskowym segmentalnym szkliwieniu kłębuszków nerkowych (tzw. enzymatyczna teoria powstawania białkomoczu) [154, 155].

Pomimo istnienia doniesień dotyczących zmian stężeń katepsyn w płynach ustrojowych w przebiegu różnych chorób, rola tych białek jako potencjalnych markerów uszkodzenia nerek jest wciąż nieokreślona.

#### **1.4.4 Interleukina 18 (IL-18)**

Interleukina 18 (IL-18) jest cytokiną prozapalną biorącą udział zarówno we wrodzonej jak i nabytej odporności. Jest wydzielana przez wiele komórek ludzkiego organizmu, takich jak osteoblasty, keratynocyty, komórki jelita cienkiego, komórki dendrytyczne i komórki nabłonka cewek nerkowych [125]. Odgrywa ważną rolę przeciwnowotworową i przeciwinfekcyjną oraz bierze udział w wielu chorobowych o podłożu niedokrwiennym takich jak: ostre uszkodzenie nerek (AKI - *ang. acute kidney injury*), jelit czy mózgu, a także zapalnym towarzyszącym np. zapaleniu stawów [125]. Stwierdzono, że stężenie IL-18 w moczu (uIL-18) wzrasta znacząco u pacjentów z rozpoznaniem AKI wykazując 90% czułości i swoistości w przewidywaniu AKI. Potwierdzono to w wielu badaniach, m. in. u pacjentów z zespołem zaburzeń oddychania, u których doszło do wzrostu uIL-18 wyprzedzającym wzrost stężenia kreatyniny we krwi [156]. Również u dzieci, u których doszło do rozwinięcia AKI po 2-3 dniach od operacji kardiochirurgicznej, wykazano wzrost uIL-18 już po 6h od zabiegu, a najwyższe stężenie (25-krotny wzrost) marker ten osiągał po 12h. Również po przeszczepieniu nerki w dniu zabiegu uIL-18 była znacząco wyższa u pacjentów, u których doszło następnie do odrzucenia przeszczepu [157]. Stężenie uIL-18 nie ulegało natomiast zmianie w przypadku zakażenia układu moczowego, zespołu



nercycowego czy w PChN [158]. Przeprowadzone dotychczas badania, wskazują więc, że IL-18 jest wskaźnikiem przede wszystkim ostrego, a nie przewlekłego uszkodzenia nerek.

#### 1.4.5 Angiotensynogen

Angiotensynogen (AGT) jest prohormonem i stanowi jeden z elementów układu RAA. Jest wytwarzany w obrębie wątroby oraz nerek [159]. RAA stanowi układ hormonalno-enzymatyczny i jego głównym zadaniem jest kontrola objętości krwi krążącej w ustroju i stężenia jonów sodowych oraz potasowych. Elementem aktywującym układ jest enzym – renina uwalniana przez komórki ziarniste aparatu przykłębuszkowego zlokalizowanego w pobliżu ściany tętniczki doprowadzającej kłębuszka nerkowego [26]. Pod wpływem reniny dochodzi do przemiany AGT w angiotensynę I, z której następnie za pomocą enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) jest wytwarzana angiotensyna II (AngII). AngII jest czynnikiem o silnych właściwościach wazokonstrykcyjnych. Pobudza wydzielanie aldosteronu przez nadnercza, który wzmacnia reabsorpcję sodu w nerkach [26]. Działanie AngII i aldosteronu jest synergistyczne i ma na celu obronę organizmu przed skutkami hipotensji w stanach zmniejszonej objętości krwi krążącej. Efekt ten również wyrażony jest w obrębie nerek, gdzie AngII obkurcza tętniczki nerkowe, przy czym silniejszy wpływ wywiera na tętniczkę odprowadzającą zwiększając w ten sposób ciśnienie wewnątrz-kłębuszkowe i podtrzymując filtrację kłębuszkową [26].

Poza ogólnoustrojowym układem RAA i związanej z tym obecnością ACE oraz produkcją AngII, istnieją lokalne układy w obrębie serca, ściany naczyń, mózgu, kory nadnerczy i nerek [160]. Pomimo, że rola lokalnie produkowanej AngII nie jest dokładnie poznana, wiadomo, że AngII może wykazywać właściwości prozapalne poprzez aktywację komórek układu immunologicznego i produkcję chemokin, a także właściwości czynnika stymulującego wzrost oraz wpływać na degradację bradykinin [161]. Stwierdzono, że wzmożona aktywność Ang II, jaką obserwuje się w CChN [162], prowadzi do przerostu komórek mezangium i nabłonka cewek nerkowych, stymuluje TNF- $\beta$ , zwiększa ciśnienie w obrębie naczyń nerkowych oraz indukuje przemiany komórkowe związane z apoptozą i różnicowaniem [27,162,163]. W przebiegu cukrzycy stwierdzono, że AngII stymuluje podocyty do produkcji VEGF, hamuje ekspresję nefryny i pobudza syntezę TGF- $\beta$ 1 prowadząc do apoptozy podocytów i sklerotyzacji kłębuszków nerkowych [31]. Wykazano też, że na układ RAA i progresję zmian w nerkach w CChN może wywierać wpływ polimorfizm genu dla AGT i ACE [164].

Aktywność wewnątrznerkową AngII można określać na podstawie stężenia angiotensynogenu w moczu (uAGT). W badaniach wykazano, że uAGT jest odzwierciedleniem AngII w takich chorobach jak nadciśnienie tętnicze czy PChN, a jego wzrost jest związany z pogorszeniem funkcji nerek [165,166,167]. Ponadto uAGT wykazuje również dodatnią zależność z ciśnieniem tętniczym i może służyć, jako wskaźnik ryzyka rozwoju NT, a nawet uszkodzenia nerek, zanim dojdzie do rozwoju klinicznych cech choroby [168]. Stwierdzono, że do wzrostu uAGT dochodzi także u pacjentów, u których nie wykazano cech CChN, tzn. u chorych bez MA i obniżonego wskaźnika GFR [169].

#### **1.4.6 Białko wiążące kwasy tłuszczowe typ wątrobowy (L-FABP: liver-type fatty acid binding protein)**

FABP jest małym (15 kDa) cytoplazmatycznym białkiem obecnym w dużych ilościach we wszystkich tkankach metabolizujących kwasy tłuszczowe [170]. W obrębie nerki zidentyfikowano dwa rodzaje FABP:

- typ wątrobowy (L-FABP) zlokalizowany w cewce proksymalnej
- typ sercowy (H-FABP) obecny w cewce dystalnej [171,172].

Dokładna funkcja FABP nie została do końca określona [129]. Wiadomo jednak, że FABP występujące w komórkach cewki proksymalnej służy do transportu wolnych kwasów tłuszczowych z cytoplazmy do mitochondriów [173] oraz prawdopodobnie wykazuje antyoksydacyjne właściwości zabezpieczające komórki cewek i tkanki śródmiąższowej przed uszkodzeniem [174]. Wzrost stężenia L-FABP w moczu obserwowano zarówno na modelach zwierzęcych jak i w badaniach klinicznych u pacjentów wykazujących cechy AKI [175,176]. Wzrost L-FABP w moczu wykazano również w PChN, a nawet uznano go za marker progresji do PChN [177]. Także w przebiegu CT2 stwierdzono dodatnią zależność L-FABP z nasileniem proteinurii [178].

## **1.5 PODSUMOWANIE**

CChN jest częstym powikłaniem CT1 oraz CT2 i główną przyczyną leczenia nerkozastępczego pacjentów dorosłych. Z uwagi na zwiększającą się zachorowalność na oba typy cukrzycy, wczesne wykrywanie powikłań ma istotne znaczenie dla światowego zdrowia. Pomimo istnienia wytycznych dotyczących diagnozowania CChN, wciąż istnieje wielu pacjentów, u których obowiązujące zalecenia są niewystarczające do rozpoznania CChN. U części pacjentów zmiany histopatologiczne w nerkach występują mimo prawidłowego GFR oraz normoalbuminurii. Postulowane przez lata uszkodzenie kłębuszków nerkowych, jako główna przyczyna rozwoju białkomoczu i CChN, zostało wyparte przez teorie uznające za pierwotną zmianę w przebiegu cukrzycy zaburzenia w obrębie cewek nerkowych. Dyskusja nad mechanizmem uszkodzenia nerek w cukrzycy wciąż pozostaje otwarta. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny sześciu substancji, których zmiany w surowicy i/lub moczu mogłyby świadczyć o uszkodzeniu nerek w przebiegu CT1 zanim dojdzie do wystąpienia CChN. Znalezienie takich wskaźników wpłynęłoby w znaczącym stopniu na dalsze poznanie patomechanizmów rozwoju CChN, a także na opracowanie profilaktyki i wdrożenie nowych, skutecznych metod terapii.

## 2 CEL PRACY

Celem badań była ocena wczesnego uszkodzenia nerek za pomocą markerów oznaczanych w moczu i surowicy krwi u dzieci w przebiegu CT1.

Cele szczegółowe:

- Ocena wczesnego uszkodzenia nerek u dzieci z CT1 na podstawie markerów uszkodzenia nerek takich jak:
  - lipokaina obojętnochłonna związana z żelatynazą (NGAL)
  - białko wiążące retinol (RBP)
  - katepsyna L (Katep)
  - interleukina 18 (IL-18)
  - angiotensynogen (AGT)
  - białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABP)
  
- Określenie wpływu różnych czynników takich jak:
  - wartość przesączania kłębuszkowego (GFR)
  - stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy (HbA1c)
  - stężenie sodu w moczu (uNa)
  - albuminuria (ACR)
  - czas trwania cukrzycy
  - metoda stosowanej terapii
  - oraz płećna wielkość uszkodzenia nerek.
  
- Próba określenia mechanizmów wpływających na wczesne uszkodzenie nerek.

### 3 MATERIAŁ I METODYKA

#### 3.1 CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

Badaniem objęto 63 dzieci chorujących z powodu CT1 w wieku od 4,6 do 17,9 lat (35 dziewczynek i 28 chłopców, średnia wieku  $13,46 \pm 2,95$  lat), leczonych w Klinice Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego Poznaniu. Czas trwania CT1 wahał się od 1,1 do 13,7 lat, a średnia wartość wynosiła  $5,16 \pm 3,39$  lat. U badanych dzieci wykluczono obecność CChN na podstawie kryteriów przyjętych za KDOQI [8]. Wydalanie albumin z moczem oceniano na podstawie wskaźnika albuminowo-kreatyninowego oznaczonego w trzech rannych porcjach moczu w okresie co najmniej 3 miesięcy. We wszystkich trzech porcjach wartość tego wskaźnika wykazywała prawidłowy wynik wynoszący poniżej 30mg/g. Spośród trzech próbek moczu, służących do oceny ACR do analizy statystycznej wybrano tę, którą pobierano w dniu uzyskania krwi służącej do oznaczeń analizowanych markerów. Wszystkie dzieci wykazywały wartość  $GFR \geq 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$  obliczanego na podstawie CystC przy użyciu wzoru opracowanego przez G. Fillera [113]. Za hiperfiltrację, zgodnie z zaleceniami innych autorów [179], uznano wartości  $GFR_F$  powyżej  $135 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , co stanowiło sumę wartości średniej i dwóch odchyłeń standardowych obliczonych dla  $GFR_F$  w grupie kontrolnej ( $110 \pm 12,41 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ). Stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy oceniano na podstawie stężenia HbA1c. Wczesne uszkodzenie nerek definiowano jako zmianę stężenia co najmniej jednego z badanych markerów przy braku mikroalbuminurii i obniżonej wartości  $GFR_F$ .

W trakcie kwalifikacji dzieci do badania w oparciu o wywiad, badanie przedmiotowe i badania biochemiczne nie stwierdzono u dzieci chorób infekcyjnych, wad wrodzonych, ani innych nieprawidłowości mogących wpłynąć na przebieg badania. Dzieci te były hospitalizowane planowo, celem rutynowej kontroli. Materiał do analizy, zarówno krew jak i mocz, były pobierane na czczo, przy okazji wykonywania obowiązkowych badań. W niektórych przypadkach np. z powodu zbyt małej ilości pobranej krwi nie przeprowadzono całości oznaczeń. Ze względu na dobro dzieci nie pobierano jej powtórnie.

U dzieci z CT1 na podstawie całodobowego ambulatoryjnego pomiaru ciśnienia (*ang. ABPM - ambulatory blood pressure monitoring*) wykluczono obecność nadciśnienia tętniczego. Za kryterium podwyższonego ciśnienia tętniczego przyjęto wartości równe/powyżej 95centyla dla płci i wzrostu w zakresie wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego oraz średniego całodobowego, dziennego i nocnego. Wartości prawidłowe

przyjęto wg zaleceń IPHA (*ang International Pediatric Hypertension Association*; <http://www.pediatrichypertension.org/BPLimitsChart.pdf>) [180].

Badane dzieci nie wykazywały cech otyłości. U wszystkich wartość BMI (body mass index) mieściły się poniżej 90 percentyla. Średnia wartość BMI wynosiła  $19,72 \pm 3,41 \text{ kg/m}^2$ . W chwili badania w grupie chorych przed okresem dojrzewania znajdowały się 2 dziewczynki. Pozostałe dzieci znajdowały się w II-III stadium dojrzałości płciowej wg. skali Tannera i Marshalla [181,182]. Badane dzieci wykazywały wyrównany stan tyreometaboliczny. Średnie stężenia hormonu tyreotropowego (TSH) wynosiły  $2,46 \pm 1,05 \text{ uIU/ml}$ , a hormonu tarczycy fT4:  $1,16 \pm 0,46 \text{ ng/dl}$ . Pacjenci z CT1 leczeni byli za pomocą intensywnej insulinoterapii. Pompę insulinową stosowano u 31 dzieci, natomiast wielokrotne iniekcji insuliny u 32 dzieci (tabela 6).

**TABELA 6. PODSTAWOWE DANE CHARAKTERYZUJĄCE GRUPĘ BADANĄ I KONTROLNĄ**

Parametr	Grupa badana		Grupa kontrolna		Poziom istotności
<b>Liczba badanych</b>	63		22		nd
<b>Płeć (K/M)</b>	35/28		8/14		nd
<b>Przed okresem dojrzewania</b>	<b>dziewczynki</b>	2	2		nd
	<b>chłopcy</b>	0	2		nd
	średnia $\pm$ SD	mediana	średnia $\pm$ SD	mediana	
<b>Wiek w chwili zachorowania (lata)</b>	$8,29 \pm 3,95$	9,88	nd		
<b>Wiek w chwili badania (lata)</b>	$13,46 \pm 2,95$	13,48	$12,12 \pm 4,74$	13,3	p=0,451
<b>Czas trwania CT1 (lata)</b>	$5,16 \pm 3,39$ (min 1,1; max 13,7)	4,83	nd		
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	$19,72 \pm 3,41$	19,15	$18,80 \pm 3,57$	18,35	p=0,341
<b>Ciśnienie tętnicze &lt; 95 pcentyla</b>	63		22		nd
<b>Metoda terapii (p/i)</b>	31/32		nd		

nd – nie dotyczy; SD – odchylenie standardowe; ABPM – całodobowy ambulatoryjny pomiar ciśnienia tętniczego; p – przy użyciu pompy insulinowej, i – za pomocą wielokrotnych iniekcji insuliny

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 22 zdrowych dzieci (8 dziewczynek i 14 chłopców, średnia wieku  $12,12 \pm 4,74$  lat), u których ze względu na podejrzenie cukrzycy, chorób układu krążenia, układu moczowego wykonano odpowiednio w Klinice Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego oraz Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej

Uniwersytetu Medycznego Poznaniu badania diagnostyczne wykluczające nieprawidłowości w zakresie w/w układów.

Zarówno chorzy i ich rodzice oraz dawcy z grupy kontrolnej byli poinformowani o celowości badań, wyrażając zgodę na ich przeprowadzenie. Projekt badania uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr 1085/08.

## 3.2 METODY

### 3.2.1 Dotychczasowe markery uszkodzenia nerek i ocena wyrównania metabolicznego cukrzycy

#### 3.2.1.1 Cystatyna C i obliczanie GFR

Zasada metody: Oznaczenie cystatyny C oparto na pomiarze immunoprecypitacji przy długości fali 540nm. Mikrocząstki powleczone przeciwciałami przeciwko ludzkiej cystatinie C dodawano do buforowanych próbek. po upływie ustalonego czasu, rejestrowany był wzrost absorbancji spowodowany immunoprecypitacją. Stopień immunoprecypitacji był proporcjonalny do stężenia cystatyny C w roztworze.

Aparatura: Analizator Konelab™ / Seria T

Materiał badany: Świeżo heparynizowane osocze

Do obliczania GFR (w ml/min/1,73m<sup>2</sup>) użyto wzoru opracowanego przez G. Fillera, którego równanie przedstawia się następująco[113]:

$$\log GFR = 1,962 + \left[ 1,123 * \log \left( \frac{1}{CysC \left( \frac{mg}{l} \right)} \right) \right]$$

#### 3.2.1.2 Mikroalbuminuria

Zasada metody: Oznaczenie albuminurii wykonano przy użyciu nefelometrycznego testu immunoprecypitacji. Surowica zawierająca przeciwciała przeciwko albuminom po rozpuszczeniu w odpowiednim buforze była dodawana do próbki moczu, a następnie po inkubacji wykonano pomiar rozproszenia światła, którego natężenie było wprost proporcjonalne do stężenia albumin w próbce. Wynik był podawany w mg/l. Aparatura: Turbox® analizator dla mikroalbuminurii. Materiał badany: ranna porcja moczu

### 3.2.1.3 HbA1c

Zasada metody: Metoda immunochemiczna służąca do ilościowego oznaczania odsetka hemoglobiny glikowanej A1c w próbkach krwi pełnej. Próbkę po poddaniu procesowi lizowania (rozpadu) uwalniającemu hemoglobine i analit-HbA1c, dodawano do matrycy z włókna szklanego opłaszczonej buforem blokującym reakcję, dzięki czemu hemoglobina i analit-HbA1c zostały zatrzymane na matrycy. Pomiaru HbA1c dokonano przez dodanie przeciwciał anti-HbA1c znakowanych fosfatazą zasadową. Fosfataza ta oddziaływała na substrat –fosforan4-metyloumbeliferylu (MUP). Ilość HbA1c była proporcjonalna do ilości związanych przeciwciał, a ilość wytworzonego produktu – do aktywności fosfatazy kompleksu antygen-przeciwciała. Układ optyczny analizatora mierzył natężenie fluorescencji.

Aparatura: Analizator Axsym firmy Abbott

Materiał badany: krew pełna pobrana do probówek z EDTA-K z fluorkiem sodu

### 3.2.2 Markery wczesnego uszkodzenia nerek

**Przygotowanie materiału:** krew i mocz pobrane w godzinach rannych, odwirowane w wirówce firmy MLW T52 z prędkością 1000 obrotów/minutę przez 10 min były następnie przechowywane w temp. -72 °C. W dniu wykonywania oznaczeń materiał rozmrażano w temperaturze pokojowej.

**Zasada metody:** Wszystkie markery (NGAL, RBP, Katep, IL-18, AGT, FABP) zostały oznaczone za pomocą metody ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*), czyli immunoenzymatycznego testu stosowanego do jakościowego i ilościowego oznaczania antygenów zawartych w próbkach materiałów biologicznych. W badaniu użyto pośredniego testu podwójnego wiązania tzw. „sandwich” ELISA, w którym wykorzystano dwa przeciwciała monoklonalne rozpoznające różne determinanty obecne w tej samej cząsteczce antygeny, w tym wypadku jednego z oznaczanych markerów.

Etapy wykonania testu:

1. Do studzienek opłaszczonych specyficznym przeciwciałem monoklonalnym dodano próbkę biologiczną zawierającą poszukiwany antygen, który następnie został związany z danym przeciwciałem.



2. Do tak związanego antygeny dodawano odczynnik zawierający wyznakowane enzymem przeciwciała, co prowadziło do powstania kompleksu immunoenzymatycznego składającego się z cząsteczki antygeny (biomarkera) umieszczonej między znakowanym przeciwciałem a przeciwciałem nieznakowanym, związanym z powierzchnią studzienki.
3. Następnie po dodaniu substratu (chromogenu) specyficznego dla enzymu, którym wyznakowane było drugie przeciwciało zachodziła reakcja enzymatyczna, dająca barwny związek będący widocznym produktem reakcji.
4. Po określonym czasie dodawano kwas siarkowy przerywający reakcję.
5. Odczyt intensywności zabarwienia (absorbancję), świadczącej o stężeniu danego antygeny (biomarkera) w próbce wykonano przy użyciu spektrofotometrycznego czytnika mikroplitek.

**Aparatura:**

- płuczka automatyczna ETI-System,
- mikropipety regulowane jedno- i wielokanałowe EPPENDORF.
- czytnik mikroplitek BIO-TEK,
- program do odczytu i ilościowej analizy GEN-5, minishaker MS1 IKA.

Do przeprowadzenia oznaczeń wykorzystano zestawy następujących firm: NGAL (CircuLex), RBP (Quantikine), katepsyna (Bender MedSystems), IL-18 (MBL), angiotensynogen (USCNK), FABP (CMIC).

**Miejsce wykonania badań:** Pracownia Immunonefrologii Kliniki Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej, Laboratorium Analityczne SK-5, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

**3.2.3 Analiza statystyczna**

Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe oraz wartość mediany. Do analizy różnic badanych parametrów pomiędzy grupą badaną i kontrolną oraz pomiędzy podgrupami w obrębie grupy badanej stosowano test nieparametryczny Manna-Whitney`a. Do analizy zależności pomiędzy badanymi parametrami zastosowano współczynnik korelacji Spearmana. Za różnice statystycznie istotne uznano wartości funkcji testowej przy poziomie istotności  $p < 0.05$ . Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 8 firmy StatSoft.

## 4 WYNIKI

### 4.1 PORÓWNANIE WYNIKÓW PODSTAWOWYCH BADAŃ LABORATORYJNYCH POMIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ

Analiza porównawcza wyników badań laboratoryjnych pomiędzy grupą badaną i kontrolną wykazała, że chore dzieci różniły się jedynie statystycznie istotnie wyższym stężeniem HbA1c w porównaniu do zdrowych ( $8,56 \pm 2,10$  vs  $5,43 \pm 0,2$  %;  $p < 0,001$ ). Pozostałe parametry w tym również ACR i  $GFR_F$  w obu grupach były podobne. W tabeli 7 i 8 przedstawiono wyniki badań laboratoryjnych oraz ich porównania pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną.

**TABELA 7. PORÓWNANIE WYNIKÓW BADAŃ LABORATORYJNYCH MIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ**

Materiał	Parametr	Grupa badana		Grupa kontrolna		Poziom istotności
		średnia $\pm$ SD	mediana	średnia $\pm$ SD	mediana	
Krew	Hgb (g/dl)	14,03 $\pm$ 1,07	13,90	13,75 $\pm$ 1,42	13,20	p=0,241
	WBC ( $\cdot 10^3$ /mm <sup>3</sup> )	6,39 $\pm$ 1,34	6,10	6,42 $\pm$ 5,69	5,69	p=0,737
	PLT ( $\cdot 10^3$ /mm <sup>3</sup> )	267,03 $\pm$ 57,43	268,00	255,71 $\pm$ 68,2	240,00	p=0,346
	Na (mmol/l)	139,44 $\pm$ 3,19	140,00	139,68 $\pm$ 2,46	139	p=0,792
	K (mmol/l)	4,14 $\pm$ 0,31	4,13	4,14 $\pm$ 0,29	4,16	p=0,745
	CRP (mg/dl)	0,41 $\pm$ 0,235	0,36	0,36 $\pm$ 0,09	0,34	p=0,059
	Kreatynina (mg/dl)	0,61 $\pm$ 0,13	0,58	0,63 $\pm$ 0,16	0,63	p=0,702
	Mocznik (mg/dl)	25,33 $\pm$ 6,05	25,00	26,36 $\pm$ 5,62	24,50	p=0,641
	HbA1c (%)	8,56 $\pm$ 2,10	8,3	5,43 $\pm$ 0,2	5,4	<b>p&lt;0,001</b>
	UA (mg/dl)	3,71 $\pm$ 1,06	3,4	4,06 $\pm$ 1,13	4,15	p=0,171
	CystC (mg/l)	0,83 $\pm$ 0,15	0,82	0,86 $\pm$ 0,10	0,85	p=0,427
Mocz	ACR (mg/g)	10,81 $\pm$ 9,84	8,39	9,13 $\pm$ 5,25	7,2	p=0,857
	uNa (mmol/l)	101,72 $\pm$ 47,52	94	129,2 $\pm$ 64,71	120,5	p=0,157
	uK (mmol/l)	30,79 $\pm$ 15,35	28	37,30 $\pm$ 16,13	32,95	p=0,129
	uKreat (mg/dl)	127,50 $\pm$ 59,80	118,83	136,62 $\pm$ 65,6	135,76	p=0,618
	$GFR_F$ (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	116,89 $\pm$ 23,18	114,49	110 $\pm$ 12,41	110,70	p=0,427
	FE <sub>Na</sub> (%)	0,54 $\pm$ 0,35	0,45	0,40 $\pm$ 0,22	0,37	p=0,156

SD – odchylenie standardowe, FE<sub>Na</sub> – frakcyjne wydalanie sodu

**TABELA 8. WYNIKI POZOSTAŁYCH BADAŃ LABORATORYJNYCH W GRUPIE BADANEJ**

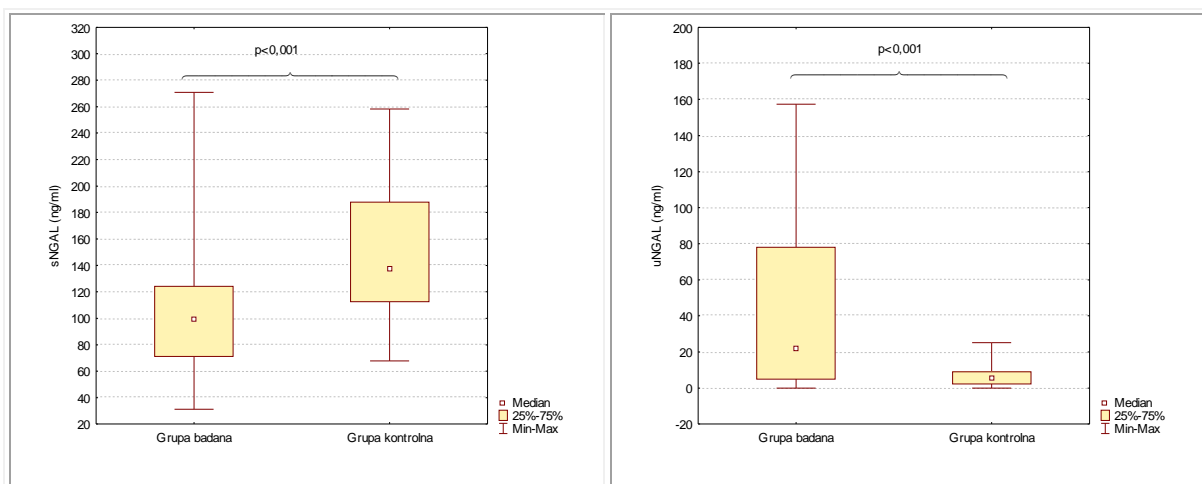
Parametr	Grupa badana	
	średnia±SD	mediana
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	195,38±46,56	184,50
TG (mg/dl)	88,00±79,13	68,00
HDL (mg/dl)	66,97±13,87	67,00
LDL (mg/dl)	115,89±32,24	115,00
Fibrynogen (mg/dl)	306,53±95,44	297,5
IAA (%)	28,32±16,19	25,5
WKT (mg/dl)	9,56±8,05	7,75
TSH (uIU/mL)	2,46±1,05	2,33
ft4 (ng/dl)	1,16±0,46	1,06

#### 4.2 PORÓWNANIE WYNIKÓW OZNACZEŃ MARKERÓW WCZESNEGO USZKODZENIA NEREK W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ

U dzieci chorujących z powodu CT1 w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono niższe stężenie sNGAL (109,96±50,06 vs 151,34±53,95 ng/ml; p<0,001) oraz wyższe uNGAL (43,02±45,68 vs 6,85±6,05 ng/ml; p<0,001). Różnice te były statystycznie istotne. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 9 oraz na rycinie nr 3.

**TABELA 9. WARTOŚCI sNGAL I uNGAL W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ**

Parametr	Grupa badana n = 63		Grupa kontrolna n = 22		Poziom istotności
	średnia±SD	mediana	średnia±SD	mediana	
sNGAL(ng/ml)	109,96±50,06	98,59	151,34±53,95	136,76	<b>p&lt;0,001</b>
uNGAL(ng/ml)	43,02±45,68	21,78	6,85±6,05	5,95	<b>p&lt;0,001</b>

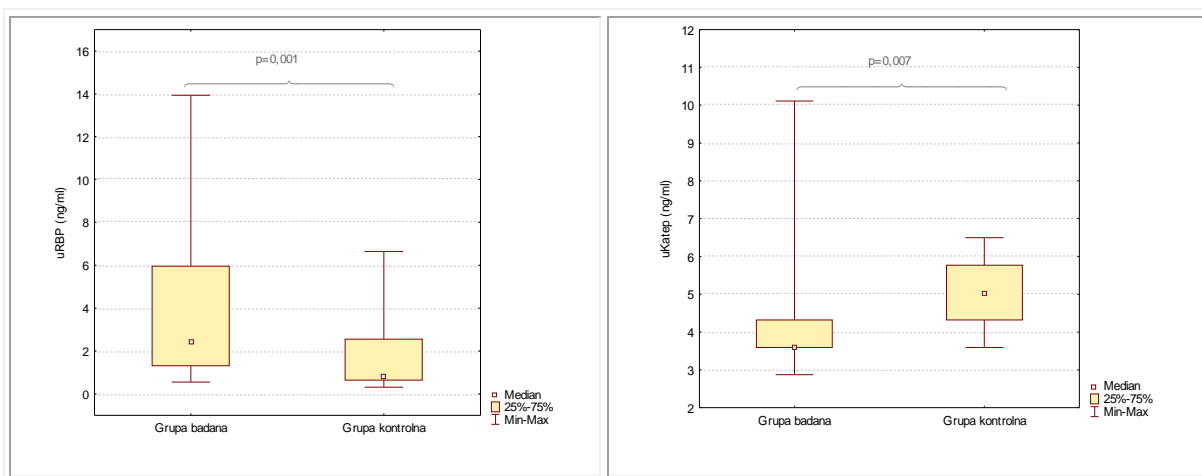


RYCINA 3. GRAFICZNE PRZEDSTAWIENIE RÓŻNIC sNGAL I uNGAL POMIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ

Wykazano również statystycznie istotne wyższe stężenie uRBP w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej ( $3,96 \pm 3,56$  vs  $1,59 \pm 1,72$  ng/ml;  $p=0,001$ ) oraz niższe uKatep ( $4,32 \pm 1,61$  vs  $5,18 \pm 0,95$  ng/ml;  $p=0,007$ ). Wyniki umieszczono w tabeli 10 oraz na rycinie 4.

TABELA 10. RÓŻNICE URBP I UKATEP POMIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ

Parametr	Grupa badana		Grupa kontrolna		Poziom istotności
	średnia $\pm$ SD	mediana	średnia $\pm$ SD.	mediana	
	n = 37		n = 22		
uRBP (ng/ml)	$3,96 \pm 3,56$	2,47	$1,59 \pm 1,72$	0,82	<b>p=0,001</b>
	n = 20		n = 10		
uKatep (ng/ml)	$4,32 \pm 1,61$	3,59	$5,18 \pm 0,95$	5,04	<b>p=0,007</b>



RYCINA 4. RÓŻNICE URBP I UKATEP POMIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ

Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie stężeń IL-18 zarówno w surowicy (sIL-18) jak i w moczu (uIL-18) oraz stężenia FABP w moczu (uFABP). Ponadto jedynie u czwórki dzieci z grupy badanej uzyskano oznaczalne wartości angiotensynogenu w moczu (uAGT). U pozostałych dzieci z grupy badanej oraz kontrolnej stężenia te były nieoznaczalnie niskie ( tabela 11).

**TABELA 11 RÓŻNICE sIL-18, uIL-18, UAGT I uFABP POMIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ**

Parametr	Grupa badana		Grupa kontrolna		Poziom istotności
	średnia±SD	mediana	średnia±SD	mediana	
	n = 22		n = 22		
sIL-18 (ng/ml)	61,53±18,26	59,96	67,32±58,31	59,96	p = 0,101
uIL-18 (ng/ml)	14,12±11,47	12,56	13,93±9,87	11,54	p = 0,825
	n = 40		n = 22		
uAGT (ng/ml)	0,148±0,474	0,00	0,00	0,00	p = 0,628
	n = 21		n = 5		
uFABP (ng/ml)	5,31±8,75	3,18	1,80±1,64	1,52	p = 0,282

#### **4.3 CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ W ZALEŻNOŚCI OD WARTOŚCI $GFR_F$ , POZIOMU WYRÓWNIANIA $CT_1$ , STĘŻENIA $uNa$ , CZASU TRWANIA $CT_1$ , STĘŻENIA $ACR$ , METODY TERAPII I PŁCI**

Grupę badaną do celów dokładnej analizy podzielono w zależności od wartości  $GFR_F$ , stężenia HbA1c i  $uNa$ , a także czasu trwania  $CT_1$ , stężenia  $ACR$  oraz płci. W analizie porównawczej uwzględniono wartości badanych (sNGAL, uNGAL, uRBP, uKatep) i dotychczasowych ( $ACR$ ,  $GFR_F$ ) markerów uszkodzenia nerek, a także czynników ryzyka rozwoju CChN (HbA1c,  $Chol_c$ , TG, czasu trwania  $CT_1$ ) oraz stężenie  $uNa$ .

##### **4.3.1 Podział grupy badanej ze względu na poziom $GFR_F$**

Badaną grupę podzielono również pod względem  $GFR_F$  na trzy podgrupy:

- $GFR_F$  poniżej 120ml/min/1,73m<sup>2</sup>, podgrupa „0“, n = 24
- $GFR_F$  powyżej 120 i poniżej 135 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, podgrupa „1“, n = 10
- $GFR_F$  powyżej 135ml/min/1,73m<sup>2</sup>, podgrupa „2“, n = 15

Hiperfiltrację stwierdzono u 15 dzieci należących do podgrupy „2”, co stanowiło 31% badanych pacjentów. Wykazano, że w tej podgrupie w porównaniu do grupy kontrolnej istnieje znacząco wyższe stężenie uNGAL ( $57,63 \pm 54,62$  vs  $6,85 \pm 6,05$  ng/ml;  $p < 0,001$ ), uRBP ( $4,62 \pm 3,30$  vs  $1,59 \pm 1,72$  ng/ml;  $p = 0,010$ ), ACR ( $14,27 \pm 6,41$  vs  $9,13 \pm 5,26$  mg/g;  $p = 0,021$ ) i HbA1c ( $10,51 \pm 2,76$  vs  $5,44 \pm 0,21\%$ ;  $p < 0,001$ ) oraz niższe sNGAL ( $111,33 \pm 48,86$  vs  $151,34 \pm 53,95$  ng/ml;  $p = 0,031$ ) i uNa ( $70,23 \pm 48,62$  vs  $129,20 \pm 64,71$  mmol/l;  $p = 0,014$ ). W podgrupie „1” o pośrednich wartościach  $GFR_F$  statystycznie istotnie wyższe wartości w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono dla wartości HbA1c ( $8,30 \pm 1,87$  vs  $5,44 \pm 0,21\%$ ;  $p < 0,001$ ) i niższe dla uKatep ( $3,24 \pm 0,51$  vs  $5,19 \pm 0,95$  ng/ml;  $p = 0,041$ ). Podgrupa „2” o najniższych wartościach  $GFR_F$  różniła się od grupy kontrolnej wyższymi stężeniami uRBP ( $5,66 \pm 3,10$  vs  $1,59 \pm 1,72$  ng/ml;  $p = 0,003$ ), HbA1c ( $7,81 \pm 1,46$  vs  $5,44 \pm 0,21\%$ ) oraz niższymi uKatep ( $3,74 \pm 0,31$  vs  $5,19 \pm 0,95$  ng/ml;  $p = 0,001$ ).

Pomiędzy poszczególnymi podgrupami znaczące różnice stwierdzono głównie pomiędzy podgrupą „0” i „2”. W podgrupie „2” wykazano statystycznie istotnie wyższe stężenia uNGAL ( $57,63 \pm 54,62$  vs  $31,99 \pm 46,35$  ng/ml;  $p = 0,022$ ), uKatep ( $5,16 \pm 2,44$  vs  $3,74 \pm 0,31$  ng/ml;  $p = 0,030$ ), ACR ( $14,27 \pm 6,41$  vs  $8,86 \pm 5,71$  mg/g;  $p = 0,027$ ) i HbA1c ( $10,51 \pm 2,76$  vs  $7,81 \pm 1,46\%$ ;  $p = 0,005$ ) oraz niższe uNa ( $70,23 \pm 48,62$  vs  $122,02 \pm 50,18$  mmol/l;  $p = 0,004$ ). Pomiędzy podgrupą „1” i „2” znaczące różnice stwierdzono jedynie w zakresie wartości uKatep, które w podgrupie „2” były wyższe ( $5,16 \pm 2,44$  vs  $3,24 \pm 0,51$  ng/ml;  $p = 0,049$ ).

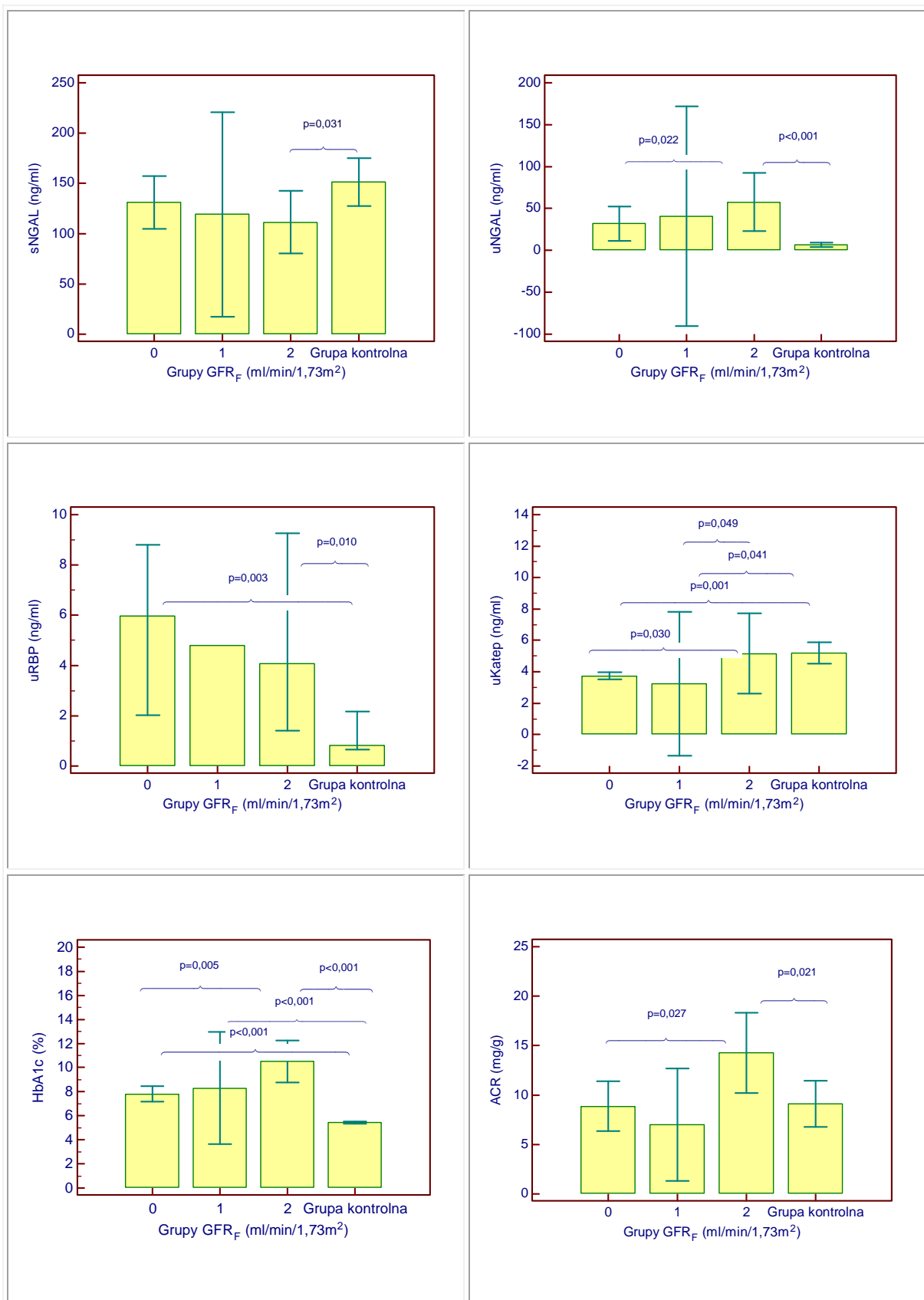
Stężenia uNa osiągały najniższe wartości w podgrupie „2” i różniły się w porównaniu do podgrupy „0” i „1” oraz grupy kontrolnej ( $70,23 \pm 48,62$  vs  $129,20 \pm 64,71$ ;  $p = 0,014$ ).

Wyniki przedstawiono w tabeli 12 i na rycinie 5.

**TABELA 12. PORÓWNANIE WYBRANYCH PARAMETRÓW W OBREBIE GRUPY BADANEJ ORAZ MIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ W ZALEŻNOŚCI OD ZAKRESU  $GFR_F$  (ML/MIN/1,73M<sup>2</sup>).**

Parametr	$GFR_F \leq 120$	$120 < GFR_F \leq 135$	$GFR_F > 135$	Grupa kontrolna
sNGAL (ng/ml)	130,99±59,09	119,13±40,90	111,33±48,86	151,34±53,95
	NS		p=0,031	
	NS			
	NS		NS	
	NS		NS	
uNGAL (ng/ml)	31,99±46,35	40,87±52,72	57,63±54,62	6,85±6,05
	NS		p<0,001	
	NS			
	NS		NS	
	p=0,022		NS	
uRBP (ng/ml)	5,66±3,10	4,79±4,77	4,62±3,30	1,59±1,72
	NS		p=0,010	
	NS			
	p=0,003		NS	
	NS		NS	
	NS		NS	
uKatep (ng/ml)	3,74±0,31	3,24±0,51	5,16±2,44	5,19±0,95
	NS		p=0,041	
	NS			
	p=0,001		NS	
	p=0,049		NS	
	p=0,030		NS	
$GFR_F$ (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	100,46±11,29	123,48±1,05	145,35±9,06	110,75±12,41
	p=0,006		p<0,001	
	p<0,001		p=0,036	
	p=0,035			
	p=0,009		NS	
ACR (mg/g)	8,86±5,71	7,01±2,29	14,27±6,41	9,13±5,26
	NS		p=0,021	
	NS			
	NS		NS	
	p=0,027		NS	
HbA1c (%)	7,81±1,46	8,30±1,87	10,51±2,76	5,44±0,21
	NS		p<0,001	
	p<0,001			
	NS		NS	
	p=0,005		NS	
uNa (mmol/l)	122,02±50,18	119,67±29,57	70,23±48,62	129,20±64,71
	NS		p=0,014	
	NS			
	NS		NS	
	p=0,004		NS	
Czas trwania CT1 (lata)	6,01±3,73	2,55±1,01	4,76±2,59	
	NS		NS	
	NS		NS	
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	188,23±37,72	182,00±28,28	203,00±53,00	
	NS		NS	
	NS		NS	
TG (mg/dl)	70,68±39,32	84,00±7,07	93,50±68,56	
	NS		NS	
	NS		NS	

NS –nieistotne statystycznie





**RYCINA 5. PORÓWNANIE sNGAL, uNGAL, uRBP, uKATEP, HbA1c I ACR W ZALEŻNOŚCI OD WARTOŚCI  $GFR_F(ML/MIN/1,73M^2)$ : „0” –  $GFR_F \leq 120$ ; „1” –  $120 < GFR_F \leq 135$ ; „2” –  $GFR_F > 135$**

### 4.3.2 Podział ze względu na poziom wyrównania metabolicznego cukrzycy

W celu wykazania zmian mogących świadczyć o uszkodzeniu nerek w zależności od wartości HbA1c podzielono grupę badaną na cztery podgrupy:

- HbA1c poniżej 6,5%, podgrupa „0”; n=9
- HbA1c powyżej 6,5% i poniżej 8%, podgrupa „1”; n=21
- HbA1c powyżej 8% i poniżej 10%, podgrupa „2”; n=20
- HbA1c powyżej 10%, podgrupa „3”; n=13

Podgrupy te porównano z grupą kontrolną oraz pomiędzy sobą. Z powodu zbyt małej liczby dzieci (poniżej 5 osób), u których oznaczono stężenie uKatep, podgrup „0” i „3” nie uwzględniono w analizie obejmującej uKatep.

Stwierdzono, że wśród dzieci o najniższych stężeniach HbA1c ( $\leq 6,5\%$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej istnieje statystycznie istotnie wyższe stężenie uRBP ( $8,91 \pm 3,89$  vs  $1,59 \pm 1,71$  ng/ml;  $p=0,011$ ) i HbA1c ( $6,02 \pm 0,29$  vs  $5,44 \pm 0,21\%$ ;  $p < 0,001$ ) oraz niższe sNGAL ( $106,62 \pm 34,96$  vs  $151,34 \pm 53,95$  ng/ml;  $p=0,026$ ). Nie wykazano różnic w zakresie uNGAL,  $GFR_F$  i ACR.

Porównując podgrupę „1” ( $6,5\% < HbA1c \leq 8\%$ ) do grupy kontrolnej stwierdzono znacząco wyższe stężenia uNGAL ( $40,346,5 \pm 37,95$  vs  $6,85 \pm 6,05$  ng/ml;  $p=0,013$ ), uRBP ( $3,27 \pm 2,69$  vs  $1,59 \pm 1,71$  ng/ml;  $p=0,032$ ) i HbA1c ( $7,21 \pm 0,40$  vs  $5,44 \pm 0,21\%$ ;  $p < 0,001$ ) oraz niższe sNGAL ( $114,32 \pm 59,11$  vs  $151,34 \pm 53,95$  ng/ml;  $p=0,011$ ). Nie wykazano różnic w zakresie ACR i  $GFR_F$ .

Kolejna „2” podgrupa ( $8\% < HbA1c \leq 10\%$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej wykazywała statystycznie istotnie wyższe stężenie uNGAL ( $41,38 \pm 45,88$  vs  $6,85 \pm 6,05$  ng/ml;  $p=0,003$ ), uRBP ( $4,28 \pm 4,21$  vs  $1,59 \pm 1,71$  ng/ml;  $p=0,005$ ) i HbA1c ( $8,98 \pm 0,55$  vs  $5,44 \pm 0,21\%$ ;  $p < 0,001$ ) oraz niższe sNGAL ( $120,43 \pm 52,86$  vs  $151,34 \pm 53,95$  ng/ml;  $p=0,044$ ). Nie wykazano różnic w zakresie ACR i  $GFR_F$ .

Wśród dzieci o HbA1c powyżej 10% w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono znacząco niższe stężenie sNGAL ( $89,15 \pm 34,56$  vs  $151,34 \pm 53,95$  ng/ml;  $p=0,001$ )

i uNa ( $62,17 \pm 36,89$  vs  $129,20 \pm 64,71$  ng/ml;  $p=0,004$ ) oraz wyższe uNGAL ( $62,41 \pm 58,29$  vs  $6,85 \pm 6,05$  ng/ml;  $p<0,001$ ) i HbA1c ( $11,86 \pm 1,41$  vs  $5,44 \pm 0,95$  ng/ml;  $p<0,001$ ), a także (czego nie obserwowano w grupach o HbA1c poniżej 10%) znacząco wyższe wartości GFR<sub>F</sub> ( $138,56 \pm 20,26$  vs  $110,75 \pm 12,41$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>;  $p=0,005$ ) oraz ACR ( $16,83 \pm 6,60$  vs  $9,13 \pm 5,26$  mg/g;  $p=0,002$ ). Nie wykazano różnic w zakresie uRBP. W podgrupie „0” w porównaniu do podgrupy „3” stwierdzono statystycznie istotnie niższe stężenie uNGAL ( $24,95 \pm 38,35$  vs  $62,41 \pm 58,29$  ng/ml;  $p=0,042$ ), HbA1c ( $6,02 \pm 0,29$  vs  $11,86 \pm 1,41$ %;  $p<0,001$ ), GFR<sub>F</sub> ( $109,09 \pm 10,22$  vs  $138,56 \pm 20,26$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>;  $p=0,013$ ) i ACR ( $8,44 \pm 5,69$  vs  $16,83 \pm 6,60$  mg/g;  $p=0,008$ ) oraz wyższe uRBP ( $8,91 \pm 3,89$  vs  $2,64 \pm 2,33$  ng/ml;  $p=0,030$ ). Podgrupy te nie różniły się w zakresie sNGAL.

Porównując podgrupę „1” do podgrupy „3” stwierdzono, że dzieci z podgrupy „1” wykazywały statystycznie istotnie niższe stężenia HbA1c ( $7,21 \pm 0,40$  vs  $11,86 \pm 1,41$ %;  $p<0,001$ ) i GFR<sub>F</sub> ( $109,86 \pm 23,79$  vs  $138,56 \pm 20,26$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>;  $p=0,018$ ). Nie wykazano różnic w zakresie sNGAL, uNGAL, uRBP.

Pomiędzy podgrupą „2” i „3” również nie wykazano istotnych statystycznie różnic dotyczących stężeń sNGAL, uNGAL i uRBP. Stwierdzono jednak w podgrupie „2” istotnie statystycznie niższe stężenia HbA1c ( $8,98 \pm 0,55$  vs  $11,86 \pm 1,41$ %;  $p<0,001$ ), GFR<sub>F</sub> ( $110,53 \pm 21,82$  vs  $138,56 \pm 20,26$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>;  $p=0,011$ ) i ACR ( $6,96 \pm 3,66$  vs  $16,83 \pm 6,60$  mg/g;  $p<0,001$ ).

Ponadto w zakresie uNa znaczące różnice stwierdzono w podgrupie „3” o najgorszej kontroli metabolicznej cukrzycy. Dzieci te wykazywały najniższe wartości uNa w porównaniu do pozostałych podgrup, jak i do grupy kontrolnej ( $62,17 \pm 36,89$  vs  $129,20 \pm 64,71$  mmol/l;  $p=0,004$ ).

Zbiornicze zestawienie różnic w grupach HbA1c umieszczono w tabeli 13 i na rycinie 6.

**TABELA 13. PORÓWNANIE WYBRANYCH PARAMETRÓW W OBRĘBIE GRUPY BADANEJ ORAZ MIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ W ZALEŻNOŚCI OD ZAKRESU HbA1c (%).**

Parametr	HbA1c ≤ 6,5	6,5 < HbA1c ≤ 8	8 < HbA1c ≤ 10	HbA1c > 10	Grupa kontrolna
sNGAL (ng/ml)	106,62±34,96	114,32±59,11	120,43±52,86	89,15±34,56	151,34±53,95
<p>NS NS NS NS NS</p> <p>NS NS NS NS NS</p> <p>p=0,026 p=0,011 p=0,044 p=0,001</p>					
uNGAL (ng/ml)	24,95±38,35	40,34±37,95	41,38±45,88	62,41±58,29	6,85±6,05
<p>NS NS NS NS NS</p> <p>NS NS NS NS NS</p> <p>p=0,042 p=0,013 p=0,003 p&lt;0,001</p>					
uRBP (ng/ml)	8,91±3,89	3,27±2,69	4,28±4,21	2,64±2,33	1,59±1,71
<p>p=0,023 NS NS NS NS</p> <p>NS NS NS NS NS</p> <p>p=0,030 p=0,032 p=0,005 NS</p>					
uKatep (ng/ml)	3,59±0,72 (n=3)	4,53±1,23	3,72±0,30	5,41±3,16 (n=4)	5,18±0,95
<p>NS NS NS NS NS</p> <p>p=0,005</p>					
GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	109,09±10,22	109,861±23,79	110,53±21,82	138,56±20,26	110,75±12,41
<p>NS NS NS NS NS</p> <p>NS NS NS NS NS</p> <p>p=0,011 p=0,013 p=0,005</p>					
ACR (mg/g)	8,44±5,69	9,09±5,46	6,96±3,66	16,83±6,60	9,13±5,26
<p>NS NS NS NS NS</p> <p>p=0,008 p=0,002 p=0,002 p=0,002</p> <p>NS NS NS NS NS</p> <p>p&lt;0,001 p=0,002</p>					
uNa (mmol/l)	126,33±43,07	118,09±52,26	99,68±32,36	62,17±36,89	129,20±64,71
<p>NS NS NS NS NS</p> <p>NS NS NS NS NS</p> <p>p=0,013 p=0,004</p>					

	<p style="text-align: center;">_____ NS _____            _____ p=0,004 _____            _____ p=0,003 _____</p>
HbA1c (%)	<p style="text-align: center;">_____ p&lt;0,001 _____            _____ p&lt;0,001 _____            _____ p&lt;0,001 _____            _____ p&lt;0,001 _____            6,02±0,29    7,21±0,40    8,98±0,55    11,86±1,41    5,44±0,21            _____ p&lt;0,001 _____ p&lt;0,001 _____ p&lt;0,001 _____            _____ p&lt;0,001 _____            _____ p&lt;0,001 _____            _____ p&lt;0,001 _____</p>
Czas trwania CT1 (l)	<p style="text-align: center;">4,67±4,15    4,82±3,58    5,69±3,66    5,22±2,42            _____ NS _____ NS _____ NS _____            _____ NS _____            _____ NS _____            _____ NS _____</p>
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	<p style="text-align: center;">175,28±32,48    182,90±23,55    187,30±31,04    237,85±70,81            _____ NS _____ NS _____ p=0,039 _____            _____ NS _____            _____ p=0,029 _____            _____ p=0,018 _____</p>
TG (mg/dl)	<p style="text-align: center;">41,29±7,74    62,90±29,39    82,90±35,88    161,53±139,72            _____ p=0,034 _____ p=0,031 _____ p=0,036 _____            _____ p=0,002 _____            _____ p&lt;0,001 _____            _____ p&lt;0,001 _____</p>

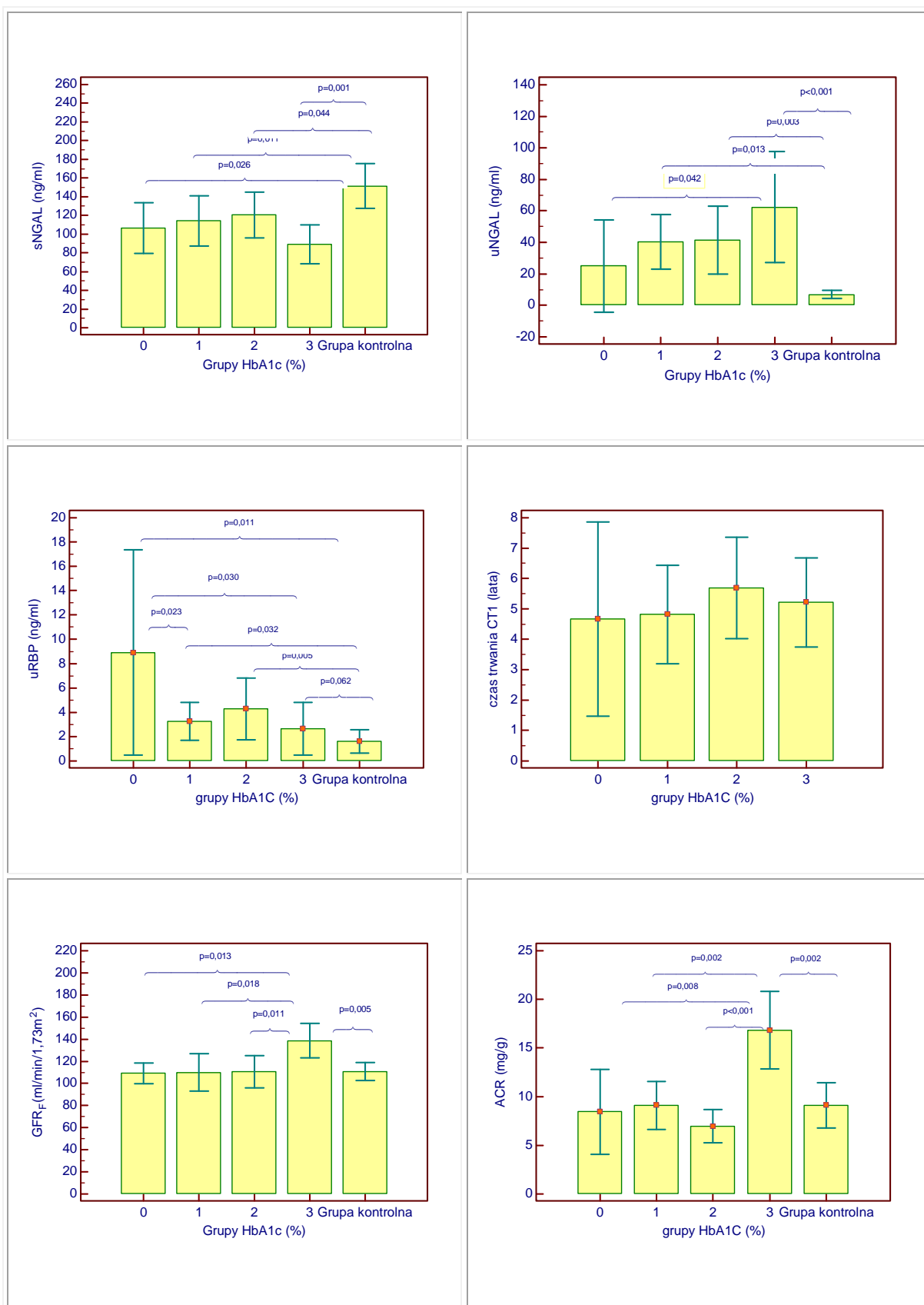
NS – nieistotne statystycznie

Podsumowując te wyniki można stwierdzić, że:

- Podgrupa „3” o najwyższych stężeniach HbA1c (>10%) wykazywała najwyższe wartości uNGAL (62,41±58,29ng/ml), GFR<sub>F</sub> (138,56±30,26ml/min/1,73m<sup>2</sup>) i ACR (16,83±6,60 mg/g) oraz najniższe sNGAL (89,15±34,56ng/ml) i uNa (62,17±36,89mmol/l). Stężenie uRBP w grupie „3” było statystycznie istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej (2,64±2,33ng/ml vs 1,59±1,71; p=0,062), jednak niższe niż w innych grupach HbA1c.

- Podgrupa „0” o najniższych wartościach HbA1c (≤ 6,5%) w porównaniu go grupy kontrolnej wśród markerów wczesnego uszkodzenia nerek wykazywała statystycznie istotnie wyższe stężenie uRBP i niższe sNGAL

- Porównując pomiędzy sobą podgrupy „0”, „1” i „2” nie stwierdzono różnic w zakresie markerów wczesnego uszkodzenia nerek (sNGAL, uNGAL, uRBP), a także ACR, GFR<sub>F</sub>, czasu trwania CT1 i uNa. Statystycznie istotne różnice stwierdzono pomiędzy tymi podgrupami a podgrupą „3” - o najwyższych wartościach HbA1c (powyżej 10%).



**RYCINA 6. PORÓWNANIE SNGAL, UNGAL, URBP, CZASU TRWANIA CT1, GFR<sub>SCr</sub> I ACR W ZALEŻNOŚCI OD HBA1C; „0” - HBA1C≤6,5%; „1” - 6,5%<HBA1C≤8%; „2” - 8%<HBA1C≤10%; „3” - HBA1C>10%**

### 4.3.3 Podział grupy badanej ze względu na stężenie uNa

Badaną grupę podzielono ze względu na stężenie uNa na trzy podgrupy:

- uNa poniżej 60mmol/l, podgrupa „0“, n=8
- uNa powyżej 60 i poniżej 150mmol/l, podgrupa „1“, n=42
- uNa powyżej 150mmol/l, podgrupa „2“, n=9

Wartości uNa w ww. podgrupach w porównaniu do grupy kontrolnej różniły się jedynie w podgrupie „0” (33,61±14,47 vs 129,20±64,71;p<0,001). Pozostałe podgrupy wykazywały stężenia uNa o wartościach podobnych do grupy kontrolnej.

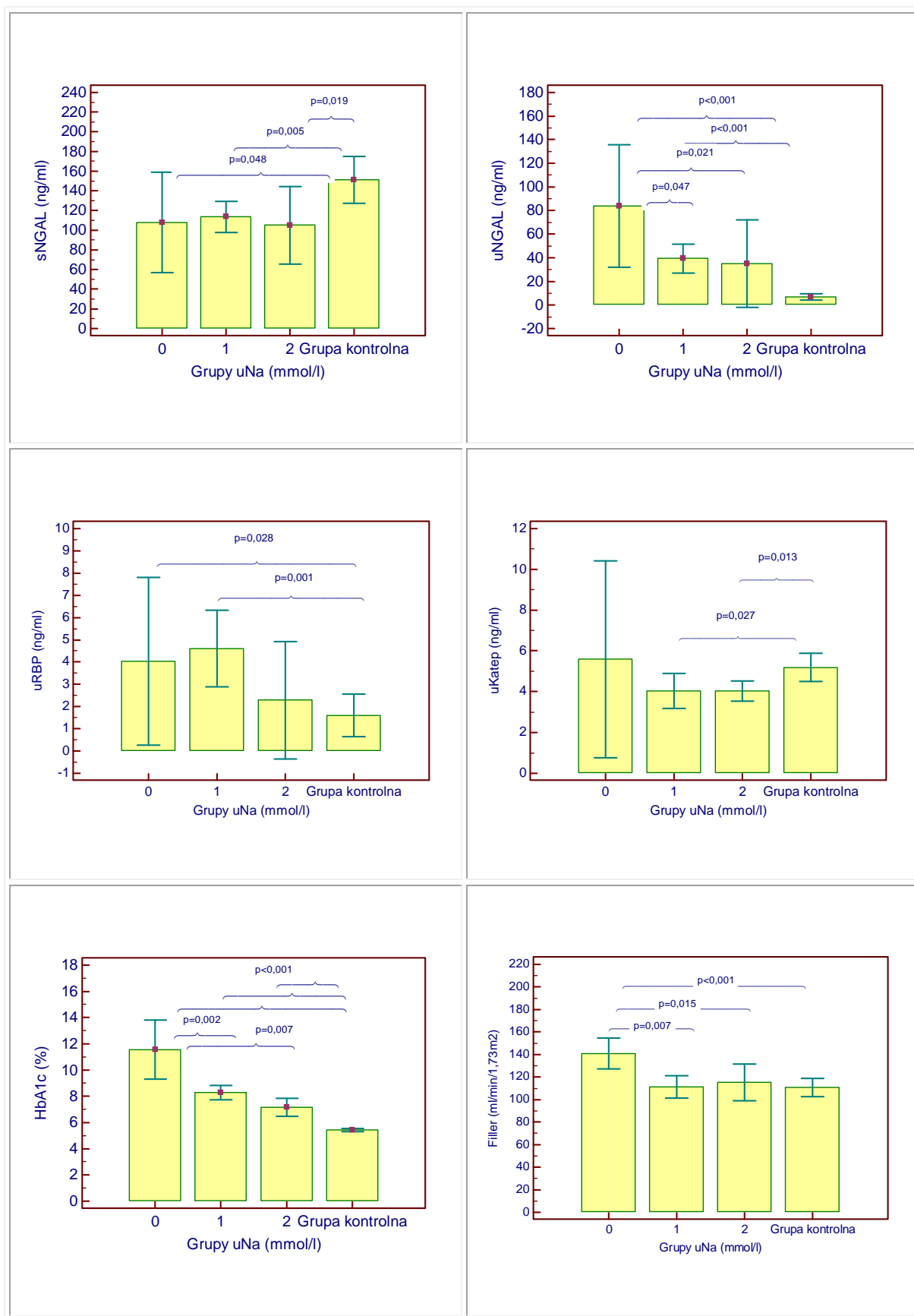
Podgrupy „0”, „1” i „2” porównano pomiędzy sobą i do grupy kontrolnej. Stwierdzono, że dzieci z podgrupy „0” o najniższym stężeniu uNa (poniżej 60mmol/l) wykazują w porównaniu do podgrupy „1” i „2”, znamienne wyższe stężenia uNGAL (88,84±62,25 vs „1”:42,45±41,14ng/ml; p=0,047; oraz 88,84±62,25 vs „2”:14,91±4,11ng/ml;p=0,021), GFR<sub>F</sub> (140,87±14,62 vs „1”:111,76±21,66ml/min/1,73m<sup>2</sup>;p=0,007 oraz 140,87±14,62 vs „2”:113,63±21,08ml/min/1,73m<sup>2</sup>;p=0,015), ACR (15,20±5,67 vs „1”:9,81±6,42ng/ml; p=0,024 oraz 15,20±5,67 vs „2”:5,88±2,92mg/g;p=0,027), HbA1c (11,58±2,69 vs „1”:8,25±1,73%;p=0,002 oraz 11,58±2,69 vs „2”:7,11±0,48%;p=0,007), Chol<sub>c</sub> (247,25±76,52 vs „1”:190,20±36,18mg/dl;p=0,023 oraz 247,25±76,52 vs „2”:174,71±30,98mg/dl; p=0,027), a także TG (174,36±172,32 vs „1”:77,02±46,37mg/dl;p=0,011 oraz 174,36±172,32 vs „2”:67,43±40,41mg/dl;p=0,043). Podgrupy „1” i „2” nie różniły się w zakresie nowych oraz dotychczasowych markerów uszkodzenia nerek, a także czynników ryzyka rozwoju CChN oprócz czasu trwania CT1. Stwierdzono, że w podgrupie „2” o najwyższych wartościach uNa (powyżej 150mmol/l) czas trwania CT1 był znamienne niższy w porównaniu do podgrupy „1” (2,43±1,35 vs 5,30±3,39lat; p=0,013) i podgrupy „0” (2,43±1,35 vs 5,67±2,31lat; p=0,009). Stężenia sNGAL, uRBP, uKatep nie różniły się pomiędzy podgrupami „0”, „1” i „2”.

W porównaniu do grupy kontrolnej znamienne wyższe stężenia uNGAL stwierdzono w podgrupie „0” i „1”. Podgrupa „2” wykazywała najniższe i podobne do grupy kontrolnej wartości uNGAL (14,91±4,11 vs 6,85±6,05ng/ml;NS). W porównaniu do zdrowych dzieci stężenia ACR, GFR<sub>F</sub> wykazywały znacząco wyższe wartości jedynie dla podgrupy „0”, a stężenia HbA1c były znacząco wyższe we wszystkich podgrupach („0”, „1” i „2”). Wyniki zestawiono w tabeli 14 i na rycinie 7.

**TABELA 14. PORÓWNANIE WYBRANYCH PARAMETRÓW W OBREBIE GRUPY BADANEJ ORAZ MIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ W ZALEŻNOŚCI OD ZAKRESU uNa (MMOL/L).**

Parametr	uNa ≤ 60	60 < uNa ≤ 150	uNa > 150	Grupa kontrolna
sNGAL (ng/ml)	108,11±60,92	113,26±49,48	105,14±59,01	151,34±53,95
	NS		p=0,019	
	NS		p=0,005	
	NS		p=0,048	
uNGAL (ng/ml)	88,84±62,25	42,45±41,14	14,91±4,11	6,85±6,05
	p=0,047		NS	
	p=0,021		p<0,001	
	NS		NS	
uRBP (ng/ml)	4,03±2,37	4,54±3,97	1,34±0,68	1,59±1,72
	NS		p=0,001	
	NS		p=0,028	
	NS		NS	
uKatep (ng/ml)	5,59±3,04	3,96±1,09	4,32±0,00	5,19±0,95
	NS		p=0,027	
	NS		p=0,013	
	NS		NS	
GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	140,87±14,62	111,76±21,66	113,63±21,08	110,75±12,41
	p=0,007		NS	
	p=0,015		NS	
	NS		NS	
ACR (mg/g)	15,20±5,67	9,81±6,42	5,88±2,92	9,13±5,26
	p=0,024		NS	
	p=0,027		NS	
	NS		NS	
HbA1c (%)	11,58±2,69	8,25±1,73	7,11±0,48	5,44±0,21
	p=0,002		p<0,001	
	p=0,007		p<0,001	
	NS		NS	
uNa (mmol/l)	33,61±14,47	100,47±27,90	187,43±35,35	129,20±64,71
	p<0,001		NS	
	p<0,001		NS	
	p<0,001		NS	
Czas trwania CT1(lata)	5,67±2,31	5,30±3,39	2,43±1,35	
	NS		p=0,013	
	p=0,009			
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	247,25±76,52	190,20±36,18	174,71±30,98	
	p=0,023		NS	
	p=0,027			
TG (mg/dl)	174,36±172,32	77,02±46,37	67,43±40,41	
	p=0,011		NS	
	p=0,043			

NS – nieistotne statystycznie



**RYCINA 7. PORÓWNANIE SNGAL, uNGAL, uRBP, uKATEP, HbA1c I GFR<sub>F</sub> W ZALEŻNOŚCI OD ZAKRESU uNa (MMOL/L), „0” - uNa ≤ 60, „1” - 60 < uNa ≤ 150; „2” - uNa > 150**



#### 4.3.4 Podział grupy w zależności od czasu trwania CT1

Grupę badaną podzielono również z względu na czas trwania CT1 na 3 podgrupy:

- poniżej 5 lat trwania CT1, podgrupa „0”; n=35
- powyżej 5lat i poniżej 10lat trwania CT1, podgrupa „1”; n=23
- powyżej 10 lat trwania CT1, podgrupa „2”; n=5

Porównano te podgrupy do grupy kontrolnej oraz pomiędzy sobą (tabela 14). W porównaniu do grupy kontrolnej dzieci chorujące z powodu CT1 krócej niż 5 lat wykazywały statystycznie istotnie wyższe stężenia uNGAL ( $36,49 \pm 41,94$  vs  $6,85 \pm 6,05$  ng/ml;  $p=0,006$ ), uRBP ( $3,92 \pm 3,02$  vs  $1,59 \pm 1,72$  ng/ml;  $p=0,012$ ), HbA1c ( $8,48 \pm 2,31$  vs  $5,43 \pm 0,21$ %;  $p<0,0001$ ), a także niższe sNGAL ( $102,62 \pm 47,22$  vs  $151,34 \pm 53,95$  ng/ml;  $p<0,001$ ) oraz uKatep ( $4,62 \pm 2,03$  vs  $5,18 \pm 0,95$  ng/ml;  $p=0,047$ ). Pacjenci z podgrupy „1” chorujący dłużej niż 5 lat i krócej niż 10 lat wykazywali znacząco wyższe stężenie uNGAL ( $53,29 \pm 50,09$  vs  $6,85 \pm 6,05$  ng/ml;  $p<0,001$ ), uRBP ( $3,92 \pm 3,02$  vs  $1,59 \pm 1,72$  ng/ml;  $p=0,003$ ) i HbA1c ( $8,85 \pm 1,88$  vs  $5,43 \pm 0,21$ %;  $p<0,001$ ) oraz niższe uKatep ( $3,84 \pm 0,37$  vs  $5,18 \pm 0,95$  ng/ml;  $p=0,009$ ). Z kolei dzieci, u których CT1 trwała najdłużej, tzn ponad 10 lat, wykazywały wyższe stężenie jedynie HbA1c% ( $7,86 \pm 1,60$  vs  $5,43 \pm 0,21$ %;  $p<0,001$ ) oraz niższe sNGAL ( $95,42 \pm 19,93$  vs  $151,34 \pm 53,95$  ng/ml;  $p=0,018$ ). Były to wartości statystycznie istotne.

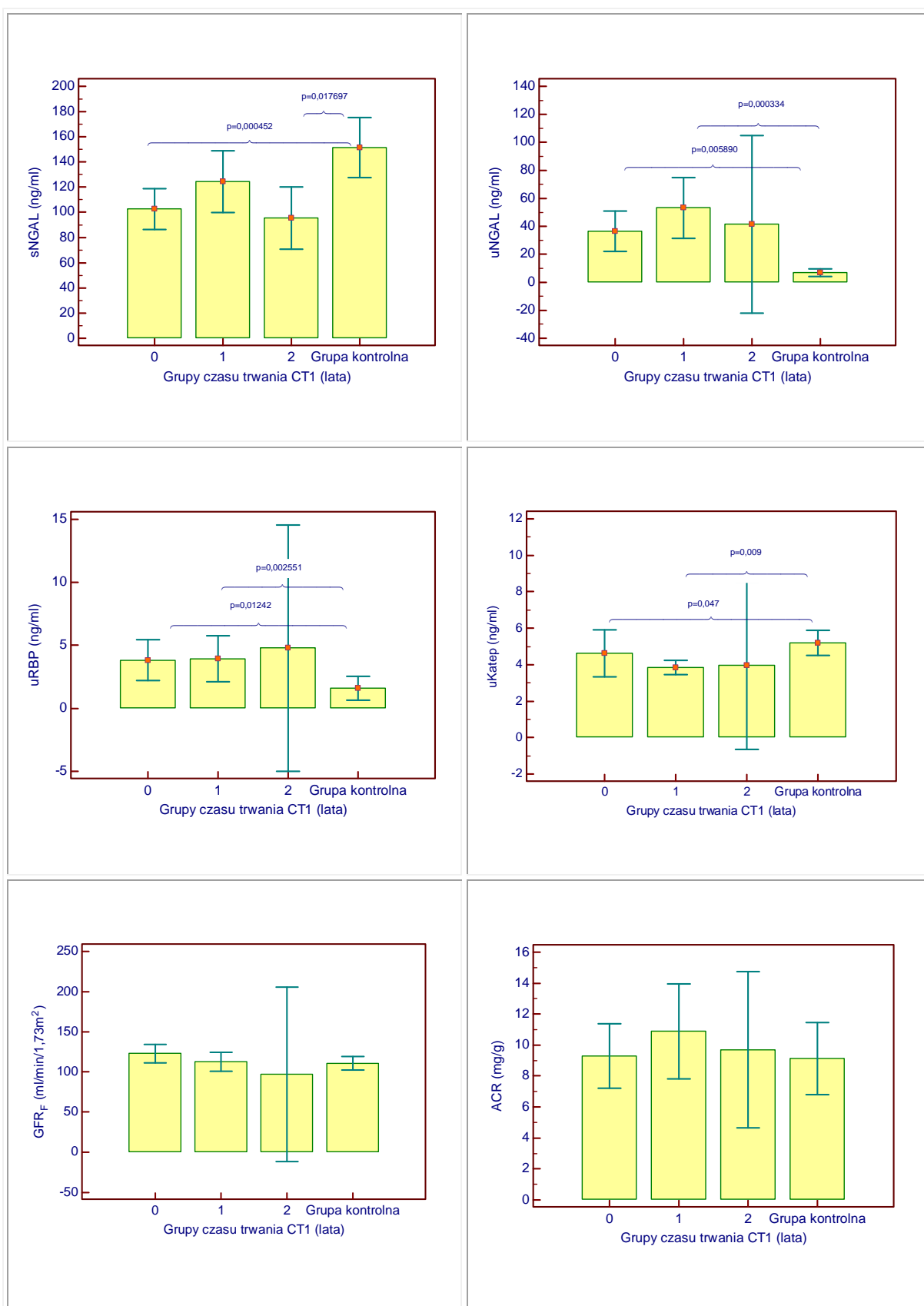
W zakresie stężenia uNa najniższe wartości wykazano dla dzieci chorujących od 5 do 10 lat zarówno w porównaniu do pozostałych podgrup jak i do grupy kontrolnej.

Wyniki zestawiono w tabeli 15 i na rycinie 8.

**TABELA 15. PORÓWNANIE WYBRANYCH PARAMETRÓW W OBRĘBIE GRUPY BADANEJ ORAZ MIĘDZY GRUPĄ BADANĄ I KONTROLNĄ W ZALEŻNOŚCI OD CZASU TRWANIA CT1 (Cz.T.CT1) (LATA).**

Parametr	Cz.T.CT1≤ 5	5 < Cz.T.CT1≤ 10	Cz.T.CT1 >10	Grupa kontrolna
sNGAL (ng/ml)	102,62±47,22	124,31±56,53	95,42±19,93	151,34±53,95
	NS		p=0,018	
	NS		p=0,073	
	NS		p<0,001	
uNGAL (ng/ml)	36,49±41,94	53,29±50,09	41,53±51,10	6,85±6,05
	NS		NS	
	NS		p<0,001	
	NS		p=0,006	
uRBP (ng/ml)	3,82±3,49	3,92±3,02	4,79±6,15	1,59±1,72
	NS		NS	
	NS		p=0,003	
	NS		p=0,012	
uKatep (ng/ml)	4,62±2,03	3,84±0,37	3,96±0,51	5,19±0,95
	NS		NS	
	NS		p=0,009	
	NS		p=0,047	
GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	123,01±22,84	112,74±23,18	97,19±12,12	110,75±12,41
	NS		NS	
	NS		NS	
	NS		NS	
ACR (mg/g)	9,31±6,07	10,88±7,09	9,68±4,10	9,13±5,26
	NS		NS	
	NS		NS	
	NS		NS	
HbA1c (%)	8,48±2,31	8,85±1,88	7,86±1,60	5,44±0,21
	NS		p<0,001	
	NS		p<0,001	
	NS		p<0,001	
uNa (mmol/l)	113,05±52,29	83,99±37,32	105,75±31,97	129,20±64,71
	NS		NS	
	NS		p=0,030	
	NS		p=0,039	
	NS		NS	
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	199,25±52,74	189,78±39,56	196,20±38,83	
	NS		NS	
	NS		NS	
TG (mg/dl)	105,06±102,41	68,13±28,84	66,80±14,36	
	NS		NS	
	NS		NS	

NS – nieistotnie statystycznie



**RYCINA 8. PORÓWNANIE SNGAL, UNGAL, uRBP, uKATEP, GFR<sub>SCH</sub> I ACR W ZALEŻNOŚCI OD CZASU TRWANIA CT1(LATA); „0” – Cz.T.CT1 ≤ 5LAT; „1” – 5 LAT < Cz.T.CT1 ≤ 10LAT; „2” – Cz.T.CT1 > 10LAT**

Porównując podgrupy pomiędzy sobą stwierdzono, że dzieci o odmiennym czasie trwania CT1 nie różniły się pod względem sNGAL, uNGAL, uRBP, uKatep, HbA1c,  $GFR_{Sch}$ ,  $GFR_F$ , czy ACR. Niezależnie od czasu trwania CT1 wartości nowych i dotychczasowych markerów uszkodzenia nerek były podobne. Wyniki zestawiono w tabeli 15 i na rycinie 8.

#### 4.3.5 Podział grupy badanej w zależności od stężenia ACR

Grupę badaną analizowano również biorąc pod uwagę wartości albuminurii. Chorych podzielono na dwie podgrupy o stężeniu ACR:

- $\leq 15\text{mg/g}$ ; (n=49), podgrupa „0”
- $>15\text{mg/g}$ ; (n=14), podgrupa „1”

Porównując dzieci o odmiennych stężeniach ACR stwierdzono, że różnice w zakresie wartości badanych markerów dotyczyły uNGAL. Grupa o wyższym stężeniu ACR wykazywała znacząco wyższe stężenie uNGAL ( $73,78 \pm 45,84$  vs  $34,24 \pm 42,09$  mg/g;  $p=0,002$ ). Spośród dotychczasowych wskaźników funkcji nerek stwierdzono statystycznie istotnie wyższe wartości  $GFR_F$  w podgrupie o wyższym stężeniu ACR ( $GFR_F=133,75 \pm 18,57$  vs  $110,65 \pm 21,81$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>;  $p=0,009$ ), zamiennie niższe wartości uNa ( $73,94 \pm 46,43$  vs  $110,36 \pm 44,93$ ;  $p=0,023$ ), jak również cechy gorszego wyrównania metabolicznego (HbA1c= $10,17 \pm 1,12$  vs  $8,11 \pm 0,86\%$ ;  $p=0,023$ ) oraz bardziej nasilone zaburzenia gospodarki lipidowej ( $Chol_c=238,57 \pm 62,34$  vs  $182,24 \pm 31,03$ mg/dl;  $p<0,001$ ). Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 16.

TABELA 16. PORÓWNANIE GRUPY BADANEJ W ZALEŻNOŚCI OD STĘŻENIA ACR

Parametr	Grupa badana		Poziom istotności
	ACR ≤ 15mg/g	ACR > 15mg/g	
	średnia±SD	średnia±SD	
sNGAL (ng/ml)	113,95±53,94	96,04±30,68	p=0,423
uNGAL (ng/ml)	34,24±42,09	73,78±45,84	<b>p=0,002</b>
uRBP (ng/ml)	3,66±3,79	4,88±2,72	p=0,066
uKatep (ng/ml)	4,06±1,01	4,92±2,57	p=0,591
Wiek (lata)	13,47±2,99	13,41±2,89	p=0,934
Wiek zachorowania	8,18±4,07	8,72±3,57	p=0,667
Czas trwania CT1(lata)	5,29±3,67	4,69±2,22	p=0,856
Kreatynina (mg/dl)	0,64±0,13	0,53±0,13	<b>p=0,007</b>
Mocznik (mg/dl)	±6,48199	±4,3784	p=0,830
Cystatyna C (mg/l)	0,87±0,14	0,73±0,09	<b>p=0,009</b>
GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	110,65±21,81	133,75±18,57	<b>p=0,009</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20,24±3,26	17,92±3,43	<b>p=0,017</b>
HbA1c (%)	8,11±0,86	10,17±1,12	<b>p=0,023</b>
ACR (mg/g)	7,16±3,53	19,57±3,82	<b>p&lt;0,001</b>
uNa (mmol/l)	110,36±44,93	73,94±46,43	<b>p=0,023</b>
FE <sub>Na</sub> (%)	0,59±0,37	0,38±0,25	<b>p=0,045</b>
uK (mmol/l)	32,62±15,79	24,94±12,64	p=0,103
uKreat (mg/dl)	135,08±64,52	104,01±34,75	p=0,302
UA (mg/dl)	3,93±1,20	3,28±0,49	<b>p=0,063</b>
CRP (mg/dl)	0,42±0,26	0,38±0,07	p=0,791
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	182,24±31,03	238,57±62,34	<b>p&lt;0,001</b>
TG (mg/dl)	74,79±41,64	132,36±141,47	p=0,147
LDL (mg/dl)	106,46±25,63	139,91±35,97	<b>p=0,006</b>
HDL (mg/dl)	64,71±14,87	72,73±9,12	p=0,073

### 4.3.6 Podział grupy badanej ze względu na metodę stosowanej terapii

Grupę badaną poddano analizie również w zależności od metody terapii, tzn. przy użyciu pompy insulinowej lub za pomocą wielokrotnych iniekcji insuliny. Wyniki zestawiono w tabeli 17.

TABELA 17. PORÓWNANIE GRUPY BADANEJ W ZALEŻNOŚCI OD STOSOWANEJ TERAPII

Parametr	Metoda terapii		Poziom istotności
	pompa	iniekcje	
	średnia±SD	średnia±SD	
sNGAL (ng/ml)	107,66±46,93	112,21±53,58	p=0,962
uNGAL (ng/ml)	43,62±47,22	42,44±44,89	p=0,934
uRBP (ng/ml)	4,15±3,71	3,80±3,52	p=0,604
uKatep (ng/ml)	4,24±1,22	4,39±1,92	p=0,704
Wiek zachorowania (lata)	7,02±3,67	9,54±3,86	<b>p=0,008</b>
Wiek w chwili badania(lata)	13,30±2,98	13,61±2,95	p=0,592
Czas trwania CT1(lata)	6,28±3,55	4,07±2,90	<b>p=0,008</b>
Kreatynina (mg/dl)	0,61±0,12	0,61±0,15	p=0,978
Mocznik (mg/dl)	25,29±5,16	25,38±6,88	p=0,731
Cystatyna C (mg/l)	0,84±0,15	0,82±0,15	p=0,553
GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	114,77±21,91	119,14±24,90	p=0,553
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19,79±3,37	19,66±3,51	p=0,880
HbA1c (%)	8,42±2,11	8,70±2,13	p=0,505
ACR (mg/g)	9,61±6,63	10,21±6,06	p=0,509
uNa (mmol/l)	97,42±39,10	105,87±54,83	p=0,762
FE <sub>Na</sub> (%)	0,48±0,36	0,60±0,35	p=0,144
uK (mmol/l)	30,03±14,26	31,54±16,55	p=0,773
uKreat (mg/dl)	139,75±63,51	113,33±53,34	p=0,191
UA (mg/dl)	3,52±0,64	3,89±1,32	p=0,537
CRP (mg/dl)	0,44±0,32	0,39±0,07	p=0,180
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	185,55±38,88	204,58±51,69	p=0,093
TG (mg/dl)	67,47±46,38	107,87±98,05	<b>p=0,002</b>
LDL (mg/dl)	106,23±30,94	128,41±30,30	<b>p=0,020</b>
HDL (mg/dl)	68,59±14,67	64,88±12,90	p=0,444

Stwierdzono, że dzieci leczone przy użyciu pompy insulinowej w porównaniu do chorych leczonych za pomocą wielokrotnych iniekcji wykazują statystycznie istotnie niższe stężenia TG ( $67,47 \pm 46,38$  vs  $107,87 \pm 98,05$  mg/dl;  $p=0,002$ ) i LDL ( $106,23 \pm 30,94$  vs  $128,41 \pm 30,30$  mg/dl;  $p=0,020$ ), a także dłuższy czas trwania CT1 ( $6,28 \pm 3,55$  vs  $4,07 \pm 2,90$  lat;  $p=0,008$ ) i młodszy wiek zachorowania na CT1 ( $7,02 \pm 3,67$  vs  $9,54 \pm 3,86$  lat;  $p=0,008$ ).

#### 4.3.7 Podział grupy badanej ze względu na płeć

Porównując grupę dziewczynek do grupy chłopców chorujących z powodu CT1 stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenia uNGAL u dziewczynek ( $54,53 \pm 48,31$  vs  $28,63 \pm 38,29$  ng/ml;  $p=0,005$ ),  $GFR_F$  ( $128,09 \pm 19,83$  vs  $106,29 \pm 21,44$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>;  $p=0,003$ ), HbA1c ( $9,15 \pm 2,07$  vs  $7,84 \pm 1,95$ %;  $p=0,005$ ); ACR ( $11,53 \pm 6,91$  vs  $7,89 \pm 4,85$  mg/g;  $p=0,037$ ), Chol<sub>c</sub> ( $207,53 \pm 49,59$  vs  $179,50 \pm 37,52$  mg/dl;  $p=0,010$ ), CRP ( $0,42 \pm 0,13$  vs  $0,41 \pm 0,32$ ;  $p=0,001$ ), WBC ( $6,75 \pm 1,51$  vs  $5,95 \pm 0,95 \cdot 10^3$ /mm<sup>3</sup>;  $p=0,023$ ) (tabela 18).

**TABELA 18. PORÓWNANIE WARTOŚCI BIOMARKERÓW ORAZ INNYCH BADAŃ LABORATORYJNYCH POMIĘDZY CHŁOPCAMI I DZIEWCZYNKAMI W OBRĘBIE GRUPY BADANEJ**

Parametr	Grupa badana		Poziom istotności
	Dziewczynki n = 35	Chłopcy n = 28	
	średnia±SD	średnia±SD	
sNGAL (ng/ml)	102,27±42,37	119,59±57,63	p = 0,350
uNGAL (ng/ml)	54,53±48,31	28,63±38,29	<b>p = 0,005</b>
uRBP (ng/ml)	3,89±4,04	4,07±2,74	p = 0,416
uKatep (ng/ml)	4,64±2,08	4,06±1,13	p = 0,382
Wiek zachorowania (lata)	7,50±3,80	9,30±3,96	p = 0,064
Wiek w chwili badania (lata)	13,08±3,29	13,92±2,42	p = 0,472
Czas trwania CT1 (lata)	5,58±3,25	4,63±3,55	p = 0,164
Kreatynina (mg/dl)	0,57±0,10	0,66±0,15	<b>p = 0,029</b>
Mocznik (mg/dl)	23,97±6,72	27,04±4,65	<b>p = 0,009</b>
Cystatyna C (mg/l)	0,76±0,11	0,90±0,15	<b>p = 0,003</b>
$GFR_F$ (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	128,09±19,83	106,29±21,44	<b>p = 0,003</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19,87±3,54	19,53±3,30	p = 0,552
HbA1c (%)	9,15±2,07	7,84±1,95	<b>p = 0,005</b>
ACR (mg/g)	11,53±6,91	7,89±4,85	<b>p = 0,037</b>
uNa (mmol/l)	88,03±38,51	120,34±52,86	<b>p = 0,013</b>
FE <sub>Na</sub> (%)	0,52±0,35	0,58±0,36	p = 0,427
uK (mmol/l)	28,31±13,33	34,17±17,45	p = 0,203

uKreat (mg/dl)	121,28±50,70	132,88±67,39	p = 0,814
UA (mg/dl)	3,53±0,63	3,97±1,45	p = 0,386
CRP (mg/dl)	0,42±0,13	0,41±0,32	<b>p = 0,001</b>
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	207,53±49,59	179,50±37,52	<b>p = 0,010</b>
TG (mg/dl)	95,94±92,53	77,30±56,35	p = 0,194
LDL (mg/dl)	123,95±33,84	106,50±28,34	p = 0,083
HDL (mg/dl)	69,95±13,22	63,50±14,18	p = 0,155

Chłopcy natomiast wykazywali istotnie statystycznie wyższe stężenia kreatyniny (0,66±0,15 vs 0,57±0,10 mg/dl; p=0,029), mocznika (27,04±4,65 vs 23,97±6,72 mg/dl; p=0,009), cystatyny C (0,90±0,15 vs 0,76±0,11; p=0,003), uNa (120,34±52,86 vs 88,03±38,51mmol/l; p=0,013) oraz Hgb (14,59±1,10 vs 13,56±0,79 g/dl; p<0,001) (tabela 19). Dziewczynki i chłopcy nie różnili się pod względem stężeń sNGAL, uRBP, uKatep, TG, HDL, LDL, a także wieku zachorowania, wieku w chwili badania, czasu trwania CT1 oraz BMI

#### 4.3.8 Podział grupy badanej ze względu na poziom wyrównania cukrzycy i płęć

Porównując grupę chorych dziewczynek do grupy chorych chłopców stwierdzono istotnie statystycznie wyższe wartości parametrów mogących wskazywać na gorsze wyrównanie CT1 u dziewczynek. Dziewczynki z grupy badanej w porównaniu do chłopców wykazywały statystycznie istotnie wyższe stężenia HbA1c 9,15±2,07 vs 7,84±1,95%; p=0,005). W związku z tym porównano grupę chłopców do dziewczynek o podobnym stężeniu HbA1c. Z grupy badanej wybrano dziewczynki o HbA1c poniżej 8,7%. Stężenia HbA1c nie różniły się w wyznaczonych grupach (dziewczynki: 7,25±1,04% vs chłopcy: 7,84±1,95%; p=0,437). Wyniki porównania zestawiono w tabeli 19.

Dziewczynki wykazujące podobne do grupy chorych chłopców wartości HbA1c nadal wykazywały istotnie statystycznie wyższe stężenia uNGAL (58,49±42,81 vs 28,63±38,29ng/ml; p=0,017), Chol<sub>c</sub> (200,00±22,54 vs 179,50±37,52mg/dl; p=0,011) i CRP (0,42±0,08 vs 0,41±0,32 mg/dl; p<0,001). Nie było natomiast różnic w zakresie GFR<sub>F</sub> (dziewczynki: 122,55±17,91ml/min/1,73m<sup>2</sup> vs chłopcy: 106,29±21,44 ml/min/1,73m<sup>2</sup>; p=0,064) oraz ACR (dziewczynki: 11,05±5,43mg/g vs chłopcy: 7,89±4,85mg/g; p=0,067).



**TABELA 19. PORÓWNANIE WYBRANYCH PARAMETRÓW LABORATORYJNYCH DZIEWCZYNEK I CHŁOPCÓW WYKAZUJĄCYCH PODOBNY ODSETEK HbA1c (7,29±1,06 vs 7,79±1,93; P = 0,251740)**

Parametr	Grupa badana		Poziom istotności
	Dziewczyny n = 15 HbA1c = 7,25±1,04%	Chłopcy n = 28 HbA1c = 7,79±1,93%	
	średnia±SD	średnia±SD	
sNGAL (ng/ml)	108,57±51,52	119,59±57,63	p=0,610
uNGAL (ng/ml)	58,49±42,81	28,63±38,29	<b>p=0,017</b>
uRBP (ng/ml)	4,98±4,06	4,07±2,74	p=0,758
uKatep (ng/ml)	3,08±1,12	0,03 ± 1,13	p=0,695
Wiek (lata)	12,19±4,27	13,92±2,42	p=0,252
Wiek zachorowania	5,90±4,17	9,29±3,96	<b>p=0,019</b>
Czas trwania CT1(lata)	6,28±3,69	4,63±3,55	p=0,098
Kreatynina (mg/dl)	0,59±0,12	0,66±0,15	p=0,216
Mocznik (mg/dl)	23,97±6,72	27,04±4,65	<b>p=0,030</b>
Cystatyna C (mg/l)	0,78±0,11	0,90±0,15	p=0,064
GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	122,55±17,91	106,29±21,44	p=0,064
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19,53±3,39	19,53±3,30	p=1,000
HbA1c (%)	7,25±1,04	7,84±1,95	p=0,437
ACR (mg/g)	11,05±5,43	7,89±4,85	p=0,067
uNa (mmol/l)	91,81±36,85	120,34±52,86	p=0,079
FE <sub>Na</sub> (%)	0,41±0,24	0,58±0,36	p=0,179
uK (mmol/l)	29,99±13,45	34,17±17,45	p=0,548
uKreat (mg/dl)	146,81±41,89	132,88±67,39	p=0,333
UA (mg/dl)	3,36±0,78	3,95±1,45	p=0,144
CRP (mg/dl)	0,42±0,08	0,41±0,32	<b>p&lt;0,001</b>
Chol <sub>c</sub> (mg/dl)	200,00±22,54	179,50±37,52	<b>p=0,011</b>
TG(mg/dl)	60,47±17,86	77,30±56,35	p=0,860
LDL (mg/dl)	122,86±17,04	106,50±28,34	p=0,040
HDL (mg/dl)	79,00±11,19	63,50±28,34	p=0,032

#### 4.4 OCENA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY PARAMETRAMI OZNACZANYMI W OBRĘBIE GRUPY BADANEJ

Do oceny zależności pomiędzy biomarkerami a pozostałymi parametrami laboratoryjnymi i klinicznymi wybrano markery, których stężenia różniły się pomiędzy grupą badaną a kontrolną, tzn sNGAL, uNGAL, uRBP, uKatep.

Podobnej analizie poddano również dotychczasowe markery uszkodzenia nerek, jak CystC, GFR<sub>F</sub> i ACR oraz czynniki ryzyka rozwoju nefropatii cukrzycowej jak HbA1c, czas trwania CT1, wiek w chwili zachorowania, Cholec i TG. Zależności te oceniono w całej grupie badanej.

##### 4.4.1 Ocena zależności pomiędzy wczesnymi markerami uszkodzenia nerek a pozostałymi parametrami w grupie badanej.

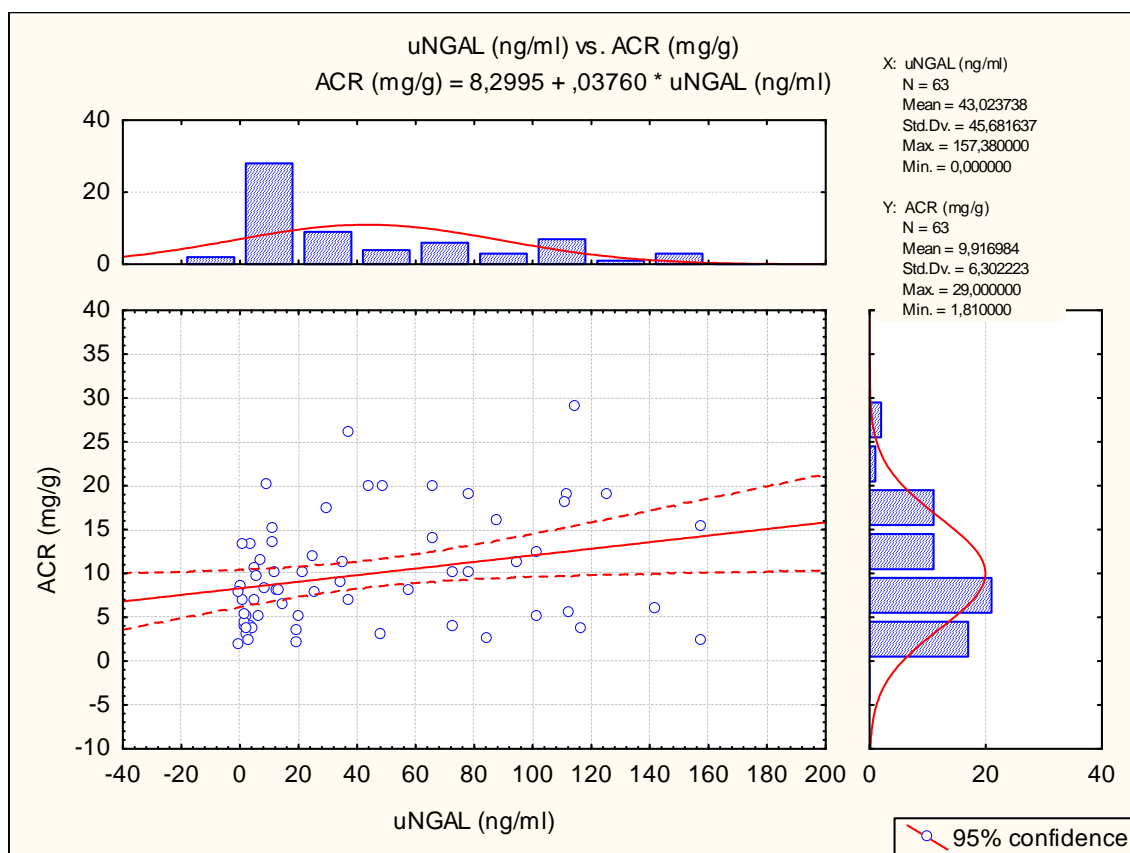
Wyniki analizy zależności pomiędzy wczesnymi markerami uszkodzenia nerek a pozostałymi parametrami w grupie badanej przedstawiono w tabeli 20 oraz wybrane na rycinie 9 i 10. Zwraca uwagę dodatnia zależność pomiędzy uNGAL i ACR ( $r=0,313$ ,  $p=0,013$ ), uNGAL i uRBP ( $r=0,383$ ;  $p=0,019$ ) oraz uKatep i GFR<sub>F</sub> ( $r=0,501$ ;  $p=0,034$ ).

TABELA 20. ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY BADANYMI BIOMARKERAMI A INNYMI PARAMETRAMI LABORATORYJNYMI W GRUPIE BADANEJ

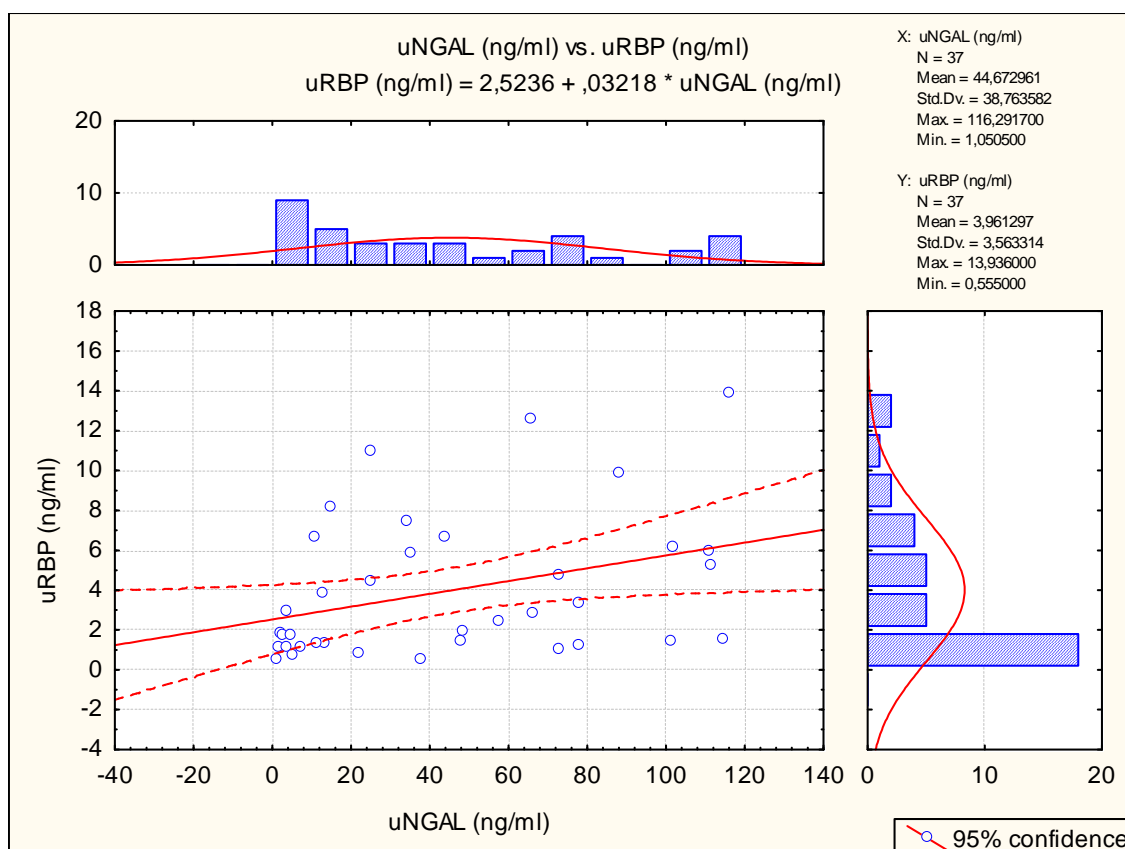
Parametr	sNGAL(ng/ml);	uNGAL(ng/ml);	uRBP (ng/ml);	uKatep (ng/ml);
sNGAL(ng/ml)	Nd	NS	NS	NS
uNGAL(ng/ml)	NS	nd	<b>r=0,383</b> <b>p=0,019</b>	NS
uRBP (ng/ml)	NS	<b>r=0,383</b> <b>p=0,019</b>	nd	NS
uKatep (ng/ml)	NS	NS	NS	nd
ACR (mg/g)	NS	<b>r=0,313</b> <b>p=0,013</b>	NS	NS
CystC (mg/l)	NS	NS	NS	<b>r=-0,501</b> <b>p= 0,034</b>
GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	NS	NS	NS	<b>r=0,501</b> <b>p=0,034</b>

WBC (1000/mm <sup>3</sup> )	<b>r=0,275</b> <b>p=0,030</b>	NS	NS	NS
HDL(mg/dl)	NS	NS	<b>r=0,534</b> <b>p=0,027</b>	NS
LDL (mg/dl)	NS	<b>r=0,320</b> <b>p=0,047</b>	NS	NS
TG (mg/dl)	NS	NS	NS	<b>r=-0,464</b> <b>p=0,045</b>
uKrea (mg/dl)	NS	NS	<b>r=0,744</b> <b>p&lt;0,001</b>	<b>r=-0,586</b> <b>p=0,007</b>
FE <sub>Na</sub> (%)	NS	NS	<b>r=-0,649</b> <b>p&lt;0,0001</b>	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	NS	NS	NS	NS

p – poziom istotności, r – współczynnik korelacji, NS – nieistotne statystycznie, nd – nie dotyczy



RYCINA 9. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY WARTOŚCIAMI UNGAL I ACR



RYCINA 10. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY WARTOŚCIAMI URBP I UNGAL

#### 4.4.2 Ocena zależności pomiędzy dotychczasowymi markerami uszkodzenia nerek a pozostałymi parametrami oznaczanymi w grupie badanej

Wyniki analizy zależności między dotychczasowymi markerami oceny funkcji nerek i pozostałymi parametrami laboratoryjnymi przedstawiono w tabeli 21. Zwraca uwagę oprócz wymienionej wyżej dodatniej zależności uNGAL i ACR oraz uKatep i  $GFR_F$ , również dodatnia zależność pomiędzy  $GFR_F$  i HbA1c ( $r=0,399$ ;  $p=0,014$ ), ACR i HbA1c ( $r=0,268$ ;  $p=0,047$ ), a także ujemna pomiędzy uNa i  $GFR_F$  ( $r=-0,374$ ;  $p=0,025$ ).

**TABELA 21. ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY DOTYCHCZASOWYMI MARKERAMI USZKODZENIA NEREK I POZOSTAŁYMI PARAMETRAMI OCENIANYMI W OBRĘBIE GRUPY BADANEJ**

Parametr	Cyst.C (mg/l)	GFR <sub>F</sub> ml/min/1,73m <sup>2</sup>	ACR (mg/g)
sNGAL(ng/ml)	NS	NS	NS
uNGAL(ng/ml)	NS	NS	<b>r=0,313 p=0,013</b>
uRBP (ng/ml)	NS	NS	NS
uKatep(ng/ml)	<b>r=-0,501 p=0,034</b>	<b>r=0,501 p=0,034</b>	NS
Cyst.C (mg/l)	nd	nd	NS
GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	nd	nd	NS
ACR (mg/g)	NS	NS	nd
HbA1c (%)	<b>r=-0,399 p=0,014</b>	<b>r=0,399 p=0,014</b>	<b>r=0,268 p=0,034</b>
uKreat (mg/dl)	NS	NS	nd
uNa (mmol/l)	<b>r=0,374 p=0,025</b>	<b>r=- 0,374 p=0,025</b>	NS
FE <sub>Na</sub> (%)	NS	NS	NS
uK (mmol/l)	NS	NS	<b>r=-0,260 p=0,047</b>
UA (mg/dl)	<b>r=0,540 p=0,004</b>	<b>r=-0,540 p=0,004</b>	<b>r=-0,433 p=0,008</b>
Urea (mg/dl)	<b>r=0,328 p=0,048</b>	<b>r=-0,328 p=0,048</b>	NS
Chol.c. (mg/dl)	NS	NS	<b>r = 0,346 p = 0,008</b>
PLT (*10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	NS	NS	<b>r = 0,309 p = 0,015</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>r=0,329 p=0,047</b>	<b>r=-0,329 p=0,047</b>	NS

p – poziom istotności, r – współczynnik korelacji, NS – nieistotne statystycznie, nd – nie dotyczy

#### 4.4.3 Ocena zależności pomiędzy czynnikami ryzyka rozwoju nefropatii cukrzycowej a pozostałymi parametrami oznaczanymi w grupie badanej.

Ocena zależności pomiędzy czynnikami ryzyka rozwoju CChN i pozostałymi parametrami wykazała kilka istotnych statystycznie zależności, spośród których na uwagę zasługuje dodatnia korelacja pomiędzy wartościami HbA1c i: 1) GFR<sub>F</sub> (r=0,400; p=0,014),

2) ACR ( $r=0,268$ ;  $p=0,034$ ), 3) Cholc ( $r=0,290$ ;  $p=0,024$ ), 4) TG ( $r=0,621$ ;  $p<0,001$ ) oraz ujemna pomiędzy HbA1c i CystC ( $r=-0,400$ ;  $p=0,014$ ) oraz HbA1c i uNa ( $r=-0,445$ ;  $p<0,001$ ).

**TABELA 22. ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY CZYNNIKAMI RYZYKA ROZWOJU DN A POZOSTAŁYMI OZNACZANYMI PARAMETRAMI**

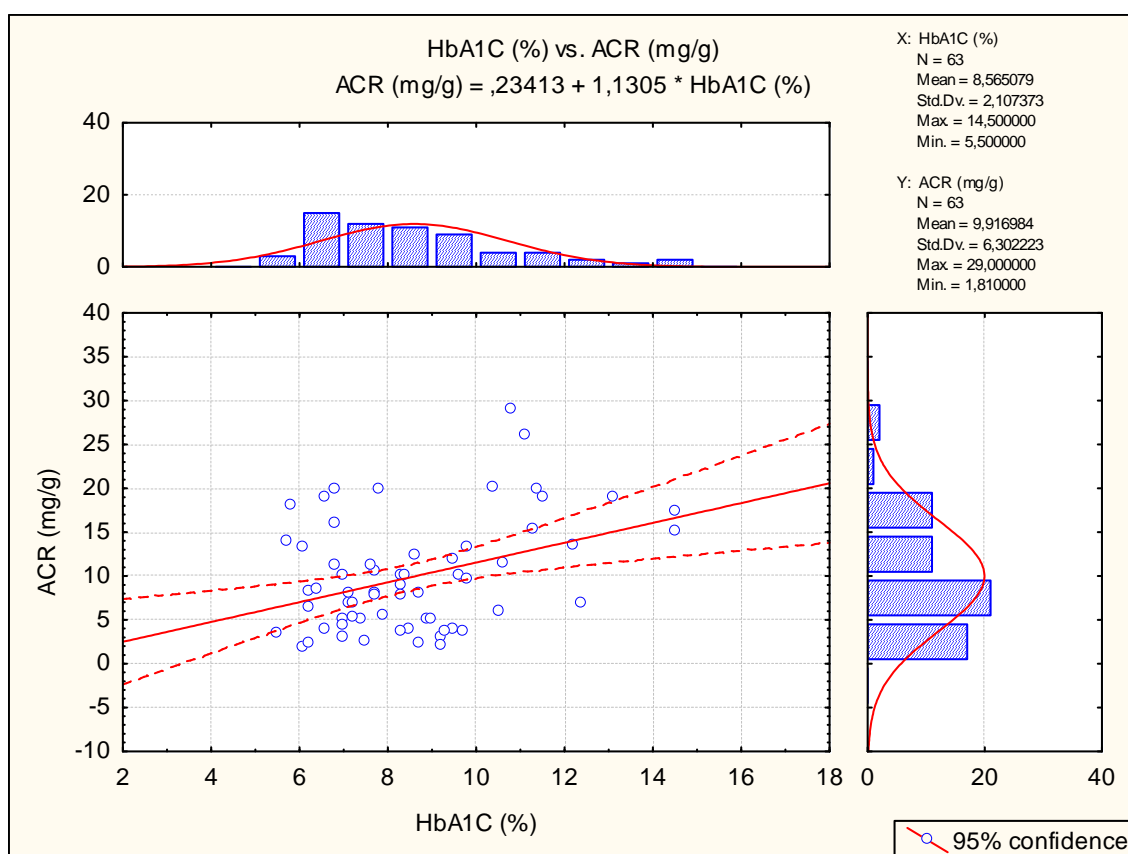
Parametr	HbA1c (%)	Czas trwania CT1 (l)	Wiek zachorow. (l)	Chol c (mg/dl)	TG (mg/dl)
sNGAL(ng/ml)	NS	NS	NS	NS	NS
uNGAL(ng/ml)	NS	NS	NS	NS	NS
uRBP (ng/ml)	NS	NS	NS	NS	NS
uKatep (ng/ml)	NS	NS	NS	NS	<b><math>r=-0,464</math> <math>p=0,045</math></b>
uRBP (ng/ml)	NS	NS	NS	NS	NS
HbA1c (%)	nd	NS	NS	<b><math>r=0,290</math> <math>p=0,024</math></b>	<b><math>r=0,622</math> <math>p&lt;0,001</math></b>
Czas trwania CT1 (l)	NS	NS	<b><math>r=-0,673</math> <math>p&lt;0,0001</math></b>	NS	NS
Wiek zachorow. (l)	NS	<b><math>r=-0,673</math> <math>p&lt;0,001</math></b>	NS	NS	NS
Cyst.C (mg/l)	<b><math>r=-0,399</math> <math>p=0,014</math></b>	NS	NS	NS	NS
GFR <sub>F</sub> (ml/mim/1,73m <sup>2</sup> )	<b><math>r=0,399</math> <math>p=0,014</math></b>	NS	NS	NS	NS
ACR (mg/g)	<b><math>r=0,268</math> <math>p=0,034</math></b>	NS	NS	<b><math>r=0,346</math> <math>p=0,008</math></b>	NS
uNa (mmol/l)	<b><math>r=-0,445</math> <math>p&lt;0,001</math></b>	NS	NS	NS	<b><math>r=-0,277</math> <math>p=0,037</math></b>
FE <sub>Na</sub> (%)					
uK (mmol/l)	<b><math>r=-0,291</math> <math>p=0,025</math></b>	<b><math>r=-0,261</math> <math>p=0,046</math></b>	NS	<b><math>r=-0,321</math> <math>p=0,016</math></b>	NS
Chol.c. (mg/dl)	<b><math>r=0,290</math> <math>p=0,024</math></b>	NS	NS	nd	NS
HDL (mg/dl)	NS	<b><math>r=0,323</math> <math>p=0,045</math></b>	<b><math>r=0,425</math> <math>p=0,007</math></b>	<b><math>r=0,434</math> <math>p=0,006</math></b>	NS
TG (mg/dl)	<b><math>r=0,621</math> <math>p&lt;0,001</math></b>	NS	NS	<b><math>r=0,508</math> <math>p&lt;0,001</math></b>	NS
LDL (mg/dl)	NS	NS	NS	<b><math>r=0,957</math> <math>p&lt;0,001</math></b>	NS
PLT (*10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	NS	NS	NS	<b><math>r=0,353</math> <math>p=0,006</math></b>	<b><math>r=0,268</math> <math>p=0,038</math></b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	NS	NS	NS	NS	NS

WBC (*10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<b>r=0,326</b> <b>p=0,009</b>	NS	NS	NS	<b>r=0,355</b> <b>p=0,005</b>
--	----------------------------------	----	----	----	----------------------------------

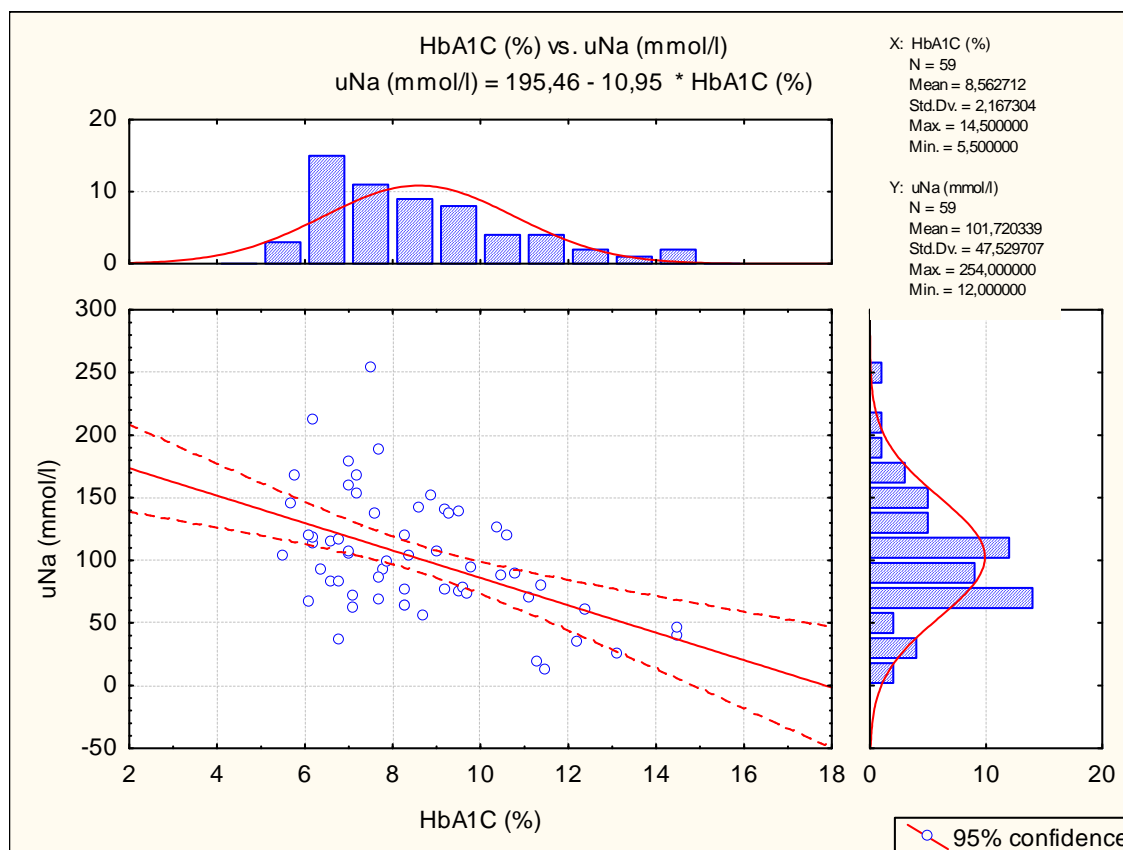
p – poziom istotności, r – współczynnik korelacji, NS – nieistotne statystycznie, nd – nie dotyczy

W zakresie kolejnych czynników ryzyka jakim jest cholesterol całkowity i trójglicerydy stwierdzono, że Chol<sub>c</sub> oprócz dodatniej korelacji z HbA1c wykazywał również dodatnią korelację z ACR (r=0,346; p=0,008) oraz pozostałymi parametrami lipidogramu (LDL, HDL, TG). Stwierdzono również, że TG oprócz wyżej wymienionych zależności, wykazywały ujemną korelację z uKatep (r=-0,464; p=0,045).

Otrzymane zależności zestawiono w tabeli 22 oraz wybrane na rycinie 11 i 12.



RYCINA 11. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY WARTOŚCIAMI ACR I HbA1C



RYCINA 12. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY WARTOŚCIAMI uNa I HbA1C

#### 4.4.4 Ocena zależności pomiędzy wybranymi parametrami w grupie chorych z $GFR_F$ powyżej lub poniżej $135ml/min/1,73m^2$ i w grupie kontrolnej

Na podstawie analizy porównawczej w grupach dzieci o różnych wartościach  $GFR_F$  stwierdzono, że chorzy o najwyższych wartościach  $GFR_F$ , tzn powyżej  $135ml/min/1,73m^2$ , wykazują najwyższe wartości HbA1c, ACR, uNGAL oraz najniższe sNGAL. Były więc to dzieci o prawdopodobnie o największym ryzyku rozwoju CChN. W związku z tym przeprowadzono analizę zależności wybranych parametrów w grupie dzieci o  $GFR_F$  powyżej  $135ml/min/1,73m^2$ . Stwierdzono, że u tych pacjentów stężenia uNGAL wykazują ujemną zależność ze stężeniami sNGAL. Ponadto wykazano również dodatnią zależność o wysokim współczynniku korelacji między stężeniem HbA1c i TG oraz ujemną między HbA1c a uNa,



TG a uNa oraz czasem trwania CT1 a uNa. Na uwagę zwróciła również zależność pomiędzy uRBP a Cholc. Wyniki zebrano w tabeli 23.

**TABELA 23. ZALEŻNOŚCI UZYSKANE U CHORYCH O WARTOŚCIACH  $GFR_F > 135 \text{ML}/\text{MIN}/1,73 \text{M}^2$**

Parametr	Współczynnik korelacji; Poziom istotności
uNGAL(ng/ml) & sNGAL(ng/ml)	$r = -0,580$ ; $p = 0,048$
uRBP(ng/ml) & Cholc(mg/dl)	$r = 0,885$ ; $p = 0,019$
uKatep(ng/dl) & PLT( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	$r = -0,894$ ; $p = 0,041$
ACR(mg/g) & PLT( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	$r = 0,709$ ; $p = 0,015$
HbA1c(%) & uNa(mmol/l)	$r = -0,589$ ; $p = 0,044$
HbA1c(%) & TG(mg/dl)	$r = 0,789$ ; $p = 0,002$
TG(mg/dl) & uNa(mg/dl)	$r = -0,622$ ; $p = 0,031$
WBC( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ ) & uNa(mmol/l)	$r = -0,656$ ; $p = 0,028$
Cz.T.CT1(l) & uNa(mmol/l)	$r = -0,671$ ; $p = 0,017$

**p** – poziom istotności, **r** – współczynnik korelacji

Podobną analizę przeprowadzono wśród pacjentów wykazujących wartości  $GFR_F$  poniżej  $135 \text{ml}/\text{min}/1,73 \text{m}^2$ . W tej grupie chorych stwierdzono  dodatnią  zależność pomiędzy stężeniami sNGAL i uNGAL oraz nieobserwowaną w grupie dzieci o najwyższych wartościach  $GFR_F$  dodatnią, o wysokim współczynniku korelacji ( $r = 0,712$ ) zależność pomiędzy sNGAL i WBC. Ponadto wartości uNGAL wykazywały także dodatnią korelację ze stężeniami TG i LDL. Wśród tych pacjentów stężenia HbA1C podobnie jak w poprzedniej grupie wykazywały dodatnią zależność z wartościami TG. Dodatkowo przedstawiono zależność pomiędzy stężeniami sNGAL i WBC uzyskaną w grupie kontrolnej. Stwierdzono, że u zdrowych dzieci wartości te wykazują pomiędzy sobą silną zależność ( $r = 0,560$ ;  $p = 0,008$ ). Wyniki zastawiono w tabeli 24.

**TABELA 24. ZALEŻNOŚCI UZYSKANE W GRUPIE BADANEJ O WARTOŚCIACH  $GFR_F \leq 135 \text{ML}/\text{MIN}/1,73 \text{M}^2$  I W GRUPIE KONTROLNEJ**

Parametr	Współczynnik „r”; Poziom istotności „p”
uNGAL(ng/ml) & sNGAL(ng/ml)	$r = 0,402$ ; $p = 0,046$
uNGAL(ng/ml) & TG(mg/dl)	$r = 0,712$ ; $p = 0,017$
uNGAL(ng/ml) & LDL(mg/dl)	$r = 0,483$ ; $p = 0,023$
sNGAL(ng/ml) & WBC( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	$r = 0,712$ ; $p < 0,001$
uKatep(ng/ml) & uNa(mmol/l)	$r = 0,679$ ; $p = 0,022$

uKatep(ng/ml) & Cholc(mg/dl)	r=-0,671; p=0,024
HbA1c(%) & TG(mg/dl)	r=0,609; p=0,002
sNGALgk(ng/ml) & WBCgk(*10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	r=0,560;p=0,008

p – poziom istotności, r – współczynnik korelacji, gk – grupa kontrolna

## 5 DYSKUSJA

Podstawą współczesnej medycyny jest wczesne wykrywanie chorób, co ma szczególnie duże znaczenie nie tylko w aspekcie wyników terapii, ale również w prewencji rozwoju groźnych dla życia powikłań. W tym celu wielokrotnie podejmowano próby znalezienia wskaźników, czyli markerów, nazywanych w przypadku organizmów żywych biomarkerami, świadczących o występowaniu danej jednostki chorobowej na wczesnym etapie jej rozwoju. Ostatnie dziesięciolecie przyniosło wiele nowych odkryć w zakresie biomarkerów chorób nerek, przede wszystkim w przebiegu ostrego ich uszkodzenia [119,120,134,135,145,156]. Również przewlekłe choroby nerek, a wśród nich CChN, wzbudziły duże zainteresowanie naukowców. Odkryto wiele nowych substancji mogących świadczyć o rozwoju CChN. Ciągłe jednak trudno jest na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań określić, które związki jednoznacznie wskazują na wczesne uszkodzenia nerek. Idealny biomarker powinien być prosty w pomiarze, nieinwazyjny, uzyskiwany z łatwo dostępnych materiałów i stosunkowo tani. Powinien również wykazywać wysoką czułość i swoistość, a jego stężenia oceniać ryzyko rozwoju choroby, ulegać zmianie w odpowiedzi na leczenie oraz dostarczać informacji o patomechanizmie choroby [183,184]. Niełatwo jest jednak znaleźć taką substancję.

Znaczną większość badań, dotyczących markerów uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy, wykonano w oparciu o modele eksperymentalne na zwierzętach oraz o obserwacje kliniczne dotyczących przede wszystkim pacjentów dorosłych. Istnieje niewiele informacji na temat biomarkerów uszkodzenia nerek w przebiegu CT1 u dzieci. Są to najczęściej doniesienia pilotażowe, wykonane na stosunkowo niedużej liczbie pacjentów lub badania eksperymentalne, wymagające dalszych analiz.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny markerów obecnych w moczu i/lub we krwi, mogących świadczyć o wczesnym uszkodzeniu nerek u dzieci w przebiegu CT1. Do badania wybrano chorych z prawidłowymi wartościami albuminurii i prawidłowym GFR, a więc niespełniających kryteriów rozpoznania CChN. Istotnym problemem było pytanie czy badane

markery pozwolą na wykrycie uszkodzenia nerek zanim dojdzie do zmiany dotychczasowych wskaźników CChN. U badanych dzieci nie wykazano innych nieprawidłowości, które mogłyby powodować uszkodzenie nerek, takich jak: infekcje, wady wrodzone, choroby układu sercowo-naczyniowego czy nadciśnienie tętnicze. Były to więc dzieci, u których stwierdzenie zmian badanych markerów mogło wynikać jedynie z obecności cukrzycy. Średni czas trwania CT1 wynosił  $5,16 \pm 3,39$  lat. Było to stosunkowo krótko, biorąc pod uwagę dotychczasowe teorie rozwoju CChN, mówiące o co najmniej 10-letnim okresie trwania cukrzycy do chwili pojawienia się białkomoczu [185,186].

Na podstawie przeprowadzonego badania stwierdzono, że spośród sześciu potencjalnych wskaźników wczesnego uszkodzenia nerek, istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą badaną i kontrolną istnieją dla trzech substancji. Wykazano, że u chorych na CT1 istnieje statystycznie istotnie wyższe stężenie uNGAL, uRBP oraz niższe sNGAL i uKatep.

Średnie stężenie uNGAL u chorych znacząco przewyższało stężenia uNGAL stwierdzone w grupie kontrolnej. Wynik ten jest zgodny z doniesieniami innych autorów, którzy przeprowadzili podobną analizę u pacjentów dorosłych chorujących z powodu CT2 [140,187,188] oraz na modelu zwierzęcym CT1 i CT2 [141]. Autorzy Ci wykazali również wzrost stężenia uNGAL u pacjentów z mikro- i makroalbuminurią i wzrost ten korelował z nasileniem albuminurii. Pacjenci z jawnym białkomoczem wykazywali najwyższe stężenia uNGAL. Również wyniki badań własnych, w których analizowano chorych wykazujących normoalbuminurię, wykazały dodatnią zależność pomiędzy uNGAL i ACR.

U dzieci z CT1 stwierdzono niższe stężenia sNGAL w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki te były różne od wyników uzyskanych u chorych z CT2, u których wykazano zwiększone stężenie sNGAL zarówno u pacjentów z normo- mikro- jak i makroalbuminurią [140]. Stwierdzono również najwyższe stężenie sNGAL u chorych z białkomoczem i jednocześnie najniższymi wartościami GFR. Zgodne z naszymi wynikami, zmniejszone stężenie sNGAL w przebiegu CT1, zaobserwowano też w badaniach eksperymentalnych prowadzonych na myszach [141]. Za przyczynę spadku sNGAL uznano wystąpienie zjawiska hiperfiltracji i wzrost przesączania kłębuszkowego NGAL. Ponadto zauważono, że myszy z CT1, wykazują zahamowanie wzrostu i zmniejszenie masy ciała, co wg tych autorów mogło wpływać na zmniejszenie stężenia sNGAL. Jest to istotne, ponieważ wg innych autorów wzrost masy ciała i otyłość może prowadzić do wzrostu sNGAL [189]. W materiale własnym

nie stwierdzono u chorych nadwagi ani otyłości, a grupa badana i kontrolna nie różniły się między sobą wartością BMI.

Innym ważnym wnioskiem uzyskanym z przeprowadzonego badania było stwierdzenie zwiększonego stężenia uRBP u dzieci z CT1. Wynik ten uzyskali także inni badacze zarówno u chorych z CT1 [142] jak i CT2 [190]. U pacjentów z CT1 obserwowano ponadto dodatnią zależność pomiędzy uRBP a HbA1C oraz czasem trwania CT1 [142], czego nie stwierdzono w materiale własnym. Wykazano natomiast dodatnią zależność pomiędzy uRBP i uNGAL, co może świadczyć o podobnym mechanizmie uszkodzenia nerek prowadzącym do wzrostu tych wskaźników.

Kolejną substancją oznaczaną w moczu była katepsyna L. Stężenie jej, oprócz znacząco niższych wartości w porównaniu do zdrowych dzieci, wykazywało dodatnią zależność z wartościami GFR<sub>F</sub>. Dostępne w literaturze doniesienia dotyczą zawartości w moczu głównie katepsyny B. Wykazano znacząco wyższe stężenia tej substancji w moczu u chorych dorosłych na CT2 [152] oraz w badaniach eksperymentalnych na myszach [191]. U pacjentów z CT2 stężenie katepsyny B w moczu wzrastało zarówno u chorych wykazujących normoalbuminurię, jak i u pacjentów z MA i makroalbuminurią [152]. Nie znaleziono doniesień dotyczących stężenia katepsyny L w moczu w przebiegu CT1, stąd oznaczenie uKatep należy uznać za badanie pilotażowe i wymagające dalszych analiz.

W analizowanym materiale zwraca również uwagę fakt, że znacząca zmiana wartości badanych markerów uszkodzenia nerek (sNGAL, uNGAL, uKatep i uRBP) występowała już u pacjentów chorujących stosunkowo krótko tj. poniżej 5 lat trwania CT1, podczas gdy wartości dotychczasowych wskaźników tzn ACR i GFR nie ulegały jeszcze wzrostowi. Biorąc pod uwagę wyrównanie metaboliczne cukrzycy zauważono, że stężenia uNGAL wzrastały już przy wartościach HbA1c mieszczących się w zakresie między 6,5 a 8%, natomiast sNGAL i uRBP – już przy wartościach HbA1c poniżej 6,5%, a więc przy dobrej i zalecanej przez ISPAD i PTD kontroli glikemicznej. Natomiast wartości ACR i GFR<sub>F</sub> uległy znaczącemu wzrostowi, gdy wartości HbA1c osiągały zakres powyżej 10%, a więc dopiero przy złym wyrównaniu metabolicznym cukrzycy. Co więcej, stężenia tych markerów (ACR i GFR<sub>F</sub>) wykazywały dodatnią zależność z HbA1c. Wyniki dotyczące dotychczasowych markerów uszkodzenia nerek są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy obserwowali wzrost ryzyka uszkodzenia nerek w postaci pojawienia się MA wraz ze zwiększeniem stężenia HbA1c [40,41,42,45,47,48]. Analiza materiału własnego wskazuje więc

na wcześniejszą zmianę stężenia marekrów uszkodzenia nerek takich jak sNGAL, uNGAL, uRBP i uKatep w porównaniu do wskaźników stosowanych dotychczas u chorych z CT1.

Ponadto wyniki badań własnych wykazały, że na stężenie sNGAL, uNGAL i uKatep ma wpływ filtracja kłębuszkowa. Dzieci o cechach hiperfiltracji ( $GFR_F$  powyżej  $135\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ) wykazywały najniższe stężenia sNGAL oraz najwyższe uNGAL, a stężenia uKatep wzrastały do wartości podobnych do grupy kontrolnej. Zbliżone wyniki uzyskali inni badacze, którzy stwierdzili u pacjentów z CT2 ujemną zależność pomiędzy stężeniami sNGAL i GFR oraz uNGAL i GFR, a także dodatnią zależność pomiędzy wartościami sNGAL i uNGAL [140]. W materiale własnym biorąc pod uwagę całą grupę chorych nie stwierdzono w.w. zależności liniowych. Zauważono jednak, że wśród chorych z cechami hiperfiltracji występuje ujemna zależność pomiędzy sNGAL i uNGAL o wysokim współczynniku korelacji. Z kolei u osób o  $GFR_F$  poniżej  $135\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  stwierdzono zależność odwrotną i wynik ten był zgodny z obserwacjami ww. autorów [140]. Oznaczałoby to, że w sytuacji hiperfiltracji dochodzi do wzmożonego przesączania sNGAL, zmniejszenia stężenia sNGAL i wzrostu uNGAL. Pośrednim dowodem potwierdzającym wpływ hiperfiltracji na stężenie sNGAL jest brak korelacji między WBC i sNGAL u dzieci z  $GFR_F$  powyżej  $135\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ . Taką korelację wykazano zarówno u dzieci z niższym GFR jak i w grupie kontrolnej. Jest to wynik tego, że NGAL jest enzymem związanym z komórkami neutrofilów i jego stężenia wykazują dodatnią zależność z liczbą leukocytów. Brak tej korelacji u chorych z hiperfiltracją wskazuje na istotny wpływ wzmożonego przesączania kłębuszkowego na stężenia sNGAL.

Związek filtracji kłębuszkowej ze stężeniem markerów uszkodzenia nerek wykazano również na podstawie uKatep, której wartości wykazywały dodatnią zależność z  $GFR_F$ . Nie stwierdzono natomiast wpływu hiperfiltracji na stężenie uRBP. Jest to wynik zgodny z doniesieniami innych autorów, którzy za przyczynę wzrostu uRBP podali zmniejszoną reabsorbcję RBP w uszkodzonych przez cukrzycę cewkach proksymalnych, zaliczając uRBP do markerów cewkowego uszkodzenia nerek [142,190]. W analizowanym materiale wykazano z kolei dodatnią zależność stężeń uRBP z uNGAL, co sugerowałoby, że na stężenie uNGAL może mieć również wpływ dysfunkcja cewek proksymalnych. Zmniejszenie reabsorpcji NGAL w cewce proksymalnej aż o 47% obserwowano w badaniu eksperymentalnym na modelu mysim CT1 [141]. Również zmianę stężenia Katepsyny B w moczu autorzy tłumaczyli uszkodzeniem cewek nerkowych i utratą tego enzymu z moczem

[152]. W niniejszym badaniu trudno było wykazać wpływ uszkodzenia cewek na stężenie Katepsyny L. Jednakże jej stężenia ulegały obniżeniu bardzo wcześnie, zanim wystąpiły cechy hiperfiltracji. Być może zaznaczał się tu potencjalnie hamujący wpływ TNF-B i Ang II na aktywność Katepsyn u chorych na cukrzycę. U badanych dzieci nie udowodniono jednak zwiększonej aktywności układu RAA. Stężenia uAGT, mogące odzwierciedlać jego aktywność, były wręcz nieoznaczalne. Nie wykazano także związku pomiędzy zmniejszoną aktywnością uKatep a wzrostem stężenia ACR. Zależność tę, wskazującą na zmniejszoną degradację albumin przez enzymy lizosomalne w cewkach proksymalnych obserwowali inni badacze, jednak byli to pacjenci z MA [153].

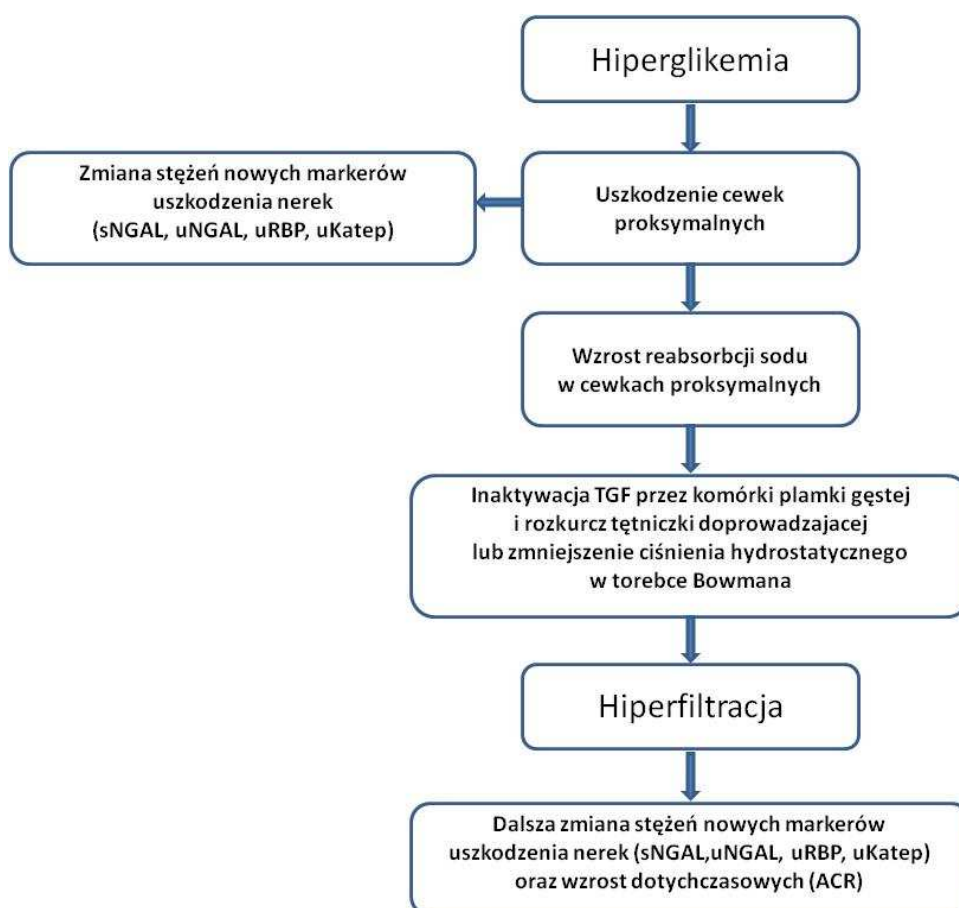
Z przeprowadzonej analizy wypływa wniosek, że znaczący wpływ na stężenia wczesnych markerów uszkodzenia nerek, zarówno sNGAL, jak i uNGAL oraz uKatep ma hiperfiltracja. Znaczenie zwiększonego przesączania kłębuszkowego podkreśla fakt, że jest to fenomen obserwowany stosunkowo często i w grupie badanych chorych wykazano je aż u 31% dzieci, co jest zgodne z doniesieniami innych badaczy [179]. Wielu autorów uważa, że hiperfiltracja jest pierwszym objawem rozpoczynającej się CChN [12,13,14,192]. W badaniu oceniającym zależność albuminurii od GFR w przebiegu CT1 wykazano, że wszyscy pacjenci, którzy po 10 latach trwania CT1 wykazywali MA, w piątym roku trwania choroby mieli najwyższe wartości GFR. U tych pacjentów stwierdzano również wyższe wartości HbA1c ( $11,4 \pm 1,9\%$ ) oraz wyższe wartości ACR [13]. Wyniki te są zgodne z obserwacjami w przeprowadzonym badaniu. Na podstawie analizy własnej wykazano dodatnią zależność pomiędzy wartościami  $GFR_F$  i HbA1c, ACR i HbA1c, jak również ACR i  $Chol_c$  oraz HbA1c i TG, a więc wykazano związek dotychczasowych markerów uszkodzenia nerek z czynnikami ryzyka rozwoju CChN. Ponadto dzieci z hiperfiltracją wykazywały znacząco wyższe wartości ACR w porównaniu do pozostałych chorych jak i grupy kontrolnej. Biorąc pod uwagę w/w wyniki jak i obserwacje innych autorów [13,14,192], należy analizowanych w niniejszym badaniu chorych o najwyższych wartościach  $GFR_F$  zaliczyć do pacjentów z grupy wysokiego ryzyka rozwoju MA i CChN.

U badanych dzieci nie można jednak wykluczyć również wczesnego uszkodzenia cewek nerkowych. Elementem łączącym te dwa zagadnienia jest tzw. cewkowa hipoteza rozwoju hiperfiltracji [32,33,34,37]. Zakłada ona, że przyczyną hiperfiltracji jest wzmożona reabsorbcja sodu w zmienionych przez cukrzycę cewkach proksymalnych. Prowadzi to w dalszym etapie do zmniejszenia stężenia sodu w cewce dystalnej, inaktywacji TGF

i rozkurczu tętniczki wstępującej kłębuszka nerkowego. Możliwe jest też, że na skutek wzmożonej reabsorpcji stężenia sodu w cewce proksymalnej dochodzi do obniżenia ciśnienia hydrostatycznego w torebce Bowmana i wzrostu ciśnienia filtracyjnego, co objawia się hiperfiltracją. W analizowanym materiale stwierdzono ujemną zależność pomiędzy stężeniem uNa i  $GFR_F$ , jak również pomiędzy uNa i HbA1c. Wyniki te wskazują na zależne od kontroli glikemicznej stężenie uNa oraz zależną od zawartości sodu w moczu wartość  $GFR_F$ . Ponadto w grupie dzieci o najniższych wartościach uNa stwierdzono najwyższe wartości ACR, jak również uNGAL, uRBP, uKatep, Chole i TG. Dzieci te wykazywały zatem największe ryzyko rozwoju CChN. Zauważono także, że w grupie o pośrednich wartościach uNa, w której stężenia dotychczasowych markerów uszkodzenia nerek (ACR i  $GFR_F$ ) były podobne do grupy kontrolnej, wartości uNGAL, uRBP ulegały już znaczącemu zwiększeniu, a sNGAL i uKatep zmniejszeniu. Z kolei u dzieci o najwyższych stężeniach uNa, a więc o najmniejszym ryzyku uszkodzenia nerek, wartości uNGAL i uRBP nie uległy znaczącemu wzrostowi. Zakładając prawdziwość hipotezy o cewkowej przyczynie hiperfiltracji, można przyjąć, że uNGAL i uRBP są markerami cewkowego uszkodzenia nerek i ich stężenie może ulec wzrostowi zanim wystąpi zjawisko hiperfiltracji i MA. Wzrost GFR może prowadzić dodatkowo do dalszego zwiększenia stężenia uNGAL, uKatep i zmniejszenia sNGAL.

Wartości uNa okazują się być więc przydatnym narzędziem do oceny funkcji nerek powiązanych ze stopniem wyrównania metabolicznego. Należy sobie jednak zdawać sprawę z tego, że samo stężenie sodu w moczu nie w pełni odzwierciedla jego wydalanie, jednak analiza  $FE_{Na}$  nie wykazała zmian w tym zakresie.

Przeprowadzona analiza wspiera więc cewkową hipotezę rozwoju hiperfiltracji u dzieci z CT1. Według niej, na skutek uszkodzenia cewek proksymalnych dochodzi do zmiany stężenia wczesnych markerów uszkodzenia nerek, a następnie na skutek utrzymującej się hiperglikemii i złego wyrównania metabolicznego dochodzi do wzrostu reabsorpcji glukozy i sodu przez zwiększoną ilość transporterów sodowo-glukozowych (SGLT1 i SGLT2) w cewkach proksymalnych. Prowadzi to do zmniejszeniem stężenia uNa, wzrostu GFR i dalszej zmiany w stężeniu badanych markerów uszkodzenia nerek i wzrostu dotychczasowych (ACR). Proponowaną hipotezę przedstawiono na rycinie 13.



**RYCINA 13. PROPONOWANA HIPOTEZA WCZESNEGO USZKODZENIA NEREK W PRZEBIEGU CT1**

W analizowanym materiale nie wykazano związku dotychczasowych i nowych markerów uszkodzenia nerek z czasem trwania CT1, uważanym za jeden z czynników ryzyka rozwoju CChN. Porównując pacjentów pomiędzy grupami o różnym czasie trwania CT1 nie stwierdzono istotnie statystycznie różnic, zarówno pomiędzy wartościami badanych markerów uszkodzenia nerek (sNGAL, uNGAL, uRBP, uKatep) jak również dotychczasowych (GFR<sub>F</sub>, ACR) oraz czynnikami ryzyka CChN (HbA1c, Chol<sub>c</sub>, TG). Wyniki naszych badań są zgodne z wieloma innymi, które takiego związku nie wykazały [50,53]. Należy jednak przyznać, że istnieją inne prace, które taką zależność potwierdzają [47,193,194]. Czas trwania cukrzycy wpływał jedynie na stężenie uNa, które było najwyższe u dzieci chorujących najkrócej (<5lat). Zależności liniowej tych dwóch parametrów jednak nie stwierdzono. Być może do wykazania związku CT1 z uszkodzeniem nerek potrzebny jest dłuższy czas obserwacji pacjentów.



W analizowanym materiale rozpatrywano również wpływ dyslipidemii na ryzyko wystąpienia powikłań nerkowych w przebiegu CT1. Hipercholesterolemię oraz hipertriglicydemię stwierdzono u dzieci o najwyższych wartościach HbA1c. Zależności tych nie wykazano w grupach o różnych wielkościach GFR<sub>F</sub>. Również dzieci o wyższych wartościach ACR (>15mg/g) nie wykazywały znacząco wyższych wartości TG, a jedynie Chol<sub>c</sub>. Wyniki te wskazywałyby na związek dyslipidemii od złego wyrównania metabolicznego cukrzycy. Nie stwierdzono zależności między TG i Chol<sub>c</sub> a badanymi markerami wczesnego uszkodzenia nerek. Na podstawie analizy materiału własnego trudno jest więc udowodnić sugerowany przez innych autorów [64,65] wpływ dyslipidemii na wystąpienie CChN i zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Porównanie chorych, w zakresie markerów uszkodzenia nerek, w zależności od stosowanej metody terapii przy użyciu osobistej pompy insulinowej lub za pomocą wielokrotnych wstrzyknięć insuliny, nie wykazało istotnych różnic. Znaczące różnice stwierdzono jedynie w odniesieniu do wieku w chwili zachorowania i długości trwania cukrzycy, co oznaczało, że dzieci, które zachorowały wcześniej i były leczone dłużej, używały pompy insulinowej. Dzieci te wykazywały statystycznie istotnie niższe stężenie TG i LDL, co przemawiałoby na korzyść stosowania osobistej pompy insulinowej. Poza tym badane dzieci nie różniły się stopniem uszkodzenia nerek i stopniem wyrównania metabolicznego cukrzycy.

Wiele różnic wykazano natomiast, porównując wyniki dzieci podzielone w zależności od płci. Stwierdzono, że dziewczynki cechują się gorszym wyrównaniem metabolicznym cukrzycy niż chłopcy, a także wyższymi wartościami dotychczasowych markerów uszkodzenia nerek (GFR<sub>F</sub> i ACR) oraz niższymi uNa oraz wyższymi wartościami czynników ryzyka rozwoju CChN (Chol<sub>c</sub>). Spośród badanych markerów uszkodzenia nerek jedynie uNGAL znacząco wzrastał u dziewczynek zarówno w całej grupie jak i tej z porównywalnym do chłopców stopniem wyrównania glikemii. Świadczyłoby to o przydatności uNGAL we wczesnym rozpoznawaniu uszkodzenia nerek, zwłaszcza u dziewczynek. Wyniki świadczące o gorszej kontroli metabolicznej u dziewczynek w porównaniu do chłopców są zgodne z doniesieniami innych autorów. W wieloośrodkowym badaniu na grupie 3805 pacjentów z CT1 wykazano znacząco wyższe stężenie HbA1c [195] i wyższe ryzyko rozwoju MA [88,188] u dziewczynek niż u chłopców. Stwierdzenie u większości badanych dziewczynek wysokich stężeń HbA1c, pozwala na zakwalifikowanie płci żeńskiej jako grupy

złego wyrównania metabolicznego cukrzycy. Naukowcy przyczynę tego zjawiska upatrują w zaburzoną w cukrzycy funkcjonowaniu osi GH/IGF-I, które u dziewczynek jest bardziej nasilone niż u chłopców [88,96,97]. Może to prowadzić u dziewczynek do gorszego wyrównania metabolicznego i wzrostu ryzyka powikłań w tym też wystąpienia MA [96]. Zjawiska te tłumaczyłyby i potwierdzały słuszność wyników własnych obserwacji. Płeć żeńska predysponuje do złego wyrównania metabolicznego CT1, a konsekwencją tego jest pojawienie się wzrostu dotychczasowych markerów uszkodzenia nerek (ACR i  $GFR_F$ ), jak również zmniejszenia uNa oraz nasilenia czynników ryzyka CChN ( $Chol_c$ ).

W materiale własnym większość dzieci znajdowała się w okresie pokwitania. Jedynie dwie dziewczynki były poniżej wieku dojrzewania. Nie prowadzono obserwacji porównujących tych samych pacjentów na przestrzeni kilku lat, stąd wpływ okresu pokwitania na wystąpienie powikłań cukrzycy nie był możliwy do wykazania.

Godną uwagi jest również obserwacja dotycząca albuminurii. Wielkość jej u wszystkich dzieci mieściła się w granicy normy tj. poniżej 30mg/g kreatyniny. Jednak dzieci z ACR powyżej 15mg/g wykazywały cechy gorszego wyrównania metabolicznego (wzrost HbA1c) oraz zwiększone ryzyko uszkodzenia nerek (wzrost uNGAL,  $GFR_F$ , uNa i  $Chol_c$ ). Wykazano także dodatnią zależność pomiędzy wartościami ACR i HbA1c. Także pacjenci o cechach hiperfiltracji i najniższym stężeniu uNa wykazywali stężenia ACR oscylujące ok. 15mg/g. Wyniki te wskazują na zależne od hiperfiltracji oraz kontroli glikemicznej nasilenie albuminurii. Nie stwierdzono jednakże liniowej zależności pomiędzy wartościami ACR oraz  $GFR_F$ . Wpływ wzmożonego GFR na stężenie ACR był trudny do wykazania. Nie udowodniono także cewkowej przyczyny białkomoczu. Pacjenci o wyższym stężeniu ACR nie wykazywali zmniejszonej aktywności uKatep. Jednak chorzy o wartościach ACR powyżej 15mg/g cechowali się zwiększonym ryzykiem rozwoju CChN i w związku z tym należałoby rozważyć obniżenie progu rozpoznawania MA do wartości 15mg/g. Warty podkreślenia jest również fakt dodatniej zależności pomiędzy stężeniami ACR i uNGAL. Wynik ten potwierdza potencjalne możliwości użycia uNGAL jako markera CChN.

W analizowanym materiale nie uzyskano istotnych statystycznie zmian w stężeniu sIL-18, uIL-18, uAGT oraz uFABP. Brak wzrostu wartości sIL-18 i uIL-18 mogłoby wskazywać na brak cech zapalenia u badanych dzieci. Również inne wskaźniki stanu zapalnego, jak CRP i WBC nie uległy znaczącemu wzrostowi w porównaniu do grupy kontrolnej. Być może na tym etapie choroby nie doszło jeszcze do rozwoju zmian zapalnych,

które mogą wystąpić w przebiegu cukrzycy [80]. Jedynie w grupie dziewczynek w porównaniu do chłopców wykazano znacząco wyższe stężenie CRP, co dodatkowo mogłoby świadczyć o większym zaawansowaniu zmian w przebiegu CT1 u dziewczynek niż u chłopców.

Stężenie uFABP i uAGT także nie różniło się pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Mogłoby to wskazywać na brak wewnątrznerkowej aktywacji układu RAA albo na zbyt niską czułość zastosowanych oznaczeń. Z kolei brak wzrostu wartości uFABP jako wskaźnika PChN mógłby świadczyć o bardzo wczesnym etapie zmian w nerkach w badanej grupie.

W podsumowaniu można stwierdzić, że oznaczone markery uszkodzenia nerek w przebiegu CT1 wskazują na obecność zmian w obrębie nerek zanim dojdzie do istotnych zmian w zakresie dotychczasowych markerów CChN. Wczesne markery uszkodzenia nerek wydają się otwierać nowe perspektywy w zakresie wykrywania zmian w nerkach w przebiegu CT1. Znaczący wzrost stężenia uNGAL i uRBP oraz spadek sNGAL obserwowano już u dzieci z najlepszym i zalecanym przez PTD i ISPAD wyrównaniem metabolicznym cukrzycy. Stężenia tych markerów oraz uKatep ulegały zmianie zanim doszło do zmniejszenia stężenia uNa i wystąpienia hiperfiltracji, jak również wzrostu ACR

Jak wspomniano wcześniej, idealny biomarker powinien być prosty w pomiarze, nieinwazyjny, uzyskiwany z łatwo dostępnych materiałów i stosunkowo tani. Powinien również wykazywać wysoką czułość i swoistość, a jego stężenia oceniać ryzyko rozwoju choroby, ulegać zmianie w odpowiedzi na leczenie oraz dostarczać informacji o patomechanizmie choroby [183,184]. W analizowanym materiale, pomimo że nie wykazano wszystkich tych cech oznaczanych wskaźników uszkodzenia nerek, uzyskane wyniki wnoszą wiele cennych informacji o patomechanizmie rozwoju CChN i być może dalsze badania pozwolą w przyszłości ostatecznie uznać oznaczone substancje za wczesne biomarkery uszkodzenia nerek w cukrzycy.

## **6 WNIOSKI:**

1. U dzieci z cukrzycą typu 1 wczesne uszkodzenie nerek, definiowane jako zmiana stężenia sNGAL, uNGAL, uRBP oraz uKateps, występuje nawet u chorych z dobrą kontrolą metaboliczną cukrzycy. Uszkodzenie to jest największe u dzieci ze złą kontrolą glikemii.
2. Uszkodzenie nerek u dzieci z cukrzycą typu 1 definiowane w oparciu o wyżej wymienione markery, pojawia się w ciągu pierwszych pięciu lat trwania choroby.
3. U dzieci z cukrzycą typu 1 bez mikroalbuminurii i obniżonej wartości filtracji kłębuszkowej nie stwierdza się zmian w zakresie stężenia sIL-18, uIL-18, uAGT, uFABP.
4. Mechanizm wczesnego uszkodzenia nerek może być związany ze zmniejszonym stężeniem sodu w moczu i ze zjawiskiem hiperfiltracji.
5. Płeć żeńska stanowi grupę ryzyka złej kontroli metabolicznej cukrzycy.
6. Wskazane jest rozważenie obniżenia progu rozpoznawania mikroalbuminurii u dzieci do wartości wskaźnika albuminowo-kreatyninowego wynoszącego 15mg/g.

## 7 STRESZCZENIE

Cukrzycowa choroba nerek (CChN) jest jednym z najczęstszych powikłań cukrzycy zarówno typu 1 (CT1) oraz typu 2 (CT2) i stanowi główną przyczynę schyłkowej niewydolności nerek (SNN) u pacjentów dorosłych. Wczesne wykrywanie uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy ma szczególne znaczenie dla efektów terapii i prewencji rozwoju groźnych dla życia powikłań.

Celem badań była ocena wczesnego uszkodzenia nerek u dzieci z CT1 za pomocą markerów oznaczanych w surowicy i w moczu. Należały do nich: lipokaina obojętnochłonna związana z żelatynazą (sNGAL i uNGAL), interleukina 18 (sIL-18 i uIL-18), białko wiążące retinol (uRBP), katepsyna (uKatep), angiotensynogen (uANG) oraz białko wiążące kwasy tłuszczowe (uFABP). Badania te poszerzono o analizę w/w parametrów w powiązaniu z innymi wykładnikami funkcji nerek (wielkość przesączania kłębuszkowego -GFR, stężenie sodu w moczu, wydalanie albumin z moczem) oraz z wynikami badań charakteryzującymi przebieg cukrzycy (stopień wyrównania metabolicznego, czas trwania cukrzycy, metoda stosowanej terapii).

Badaniem objęto 63 dzieci (35 dziewczynek i 28 chłopców) chorujących z powodu CT1 w wieku od 4,6 do 17,9 lat. Średni czas trwania CT1 wynosił  $5,16 \pm 3,39$  lat. U wszystkich pacjentów wykluczono obecność CChN, jak również innych chorób mogących wpływać na analizowane oznaczenia. Wszystkie dzieci wykazywały normo-albuminurię ( $\leq 30\text{mg/g}$ ) i prawidłowe GFR ( $\geq 90\text{ml/min/1,73m}^2$ ). Dla oceny wydalania albumin z moczem użyto wskaźnika albuminowo-kreatyninowego (ACR), natomiast GFR obliczano na podstawie stężenia cystatyny C w surowicy krwi przy użyciu wzoru Fillera ( $\text{GFR}_F$ ). Stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy oceniano w oparciu o stężenie hemoglobiny glikowanej HbA1c. Grupę kontrolną stanowiło 22 zdrowych dzieci w podobnym przedziale wiekowym.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono u dzieci z CT1 istotnie wyższe stężenia uNGAL i uRBP oraz niższe sNGAL i uKatep. Zmiany te obserwowano wcześniej niż zmiany dotychczasowych wskaźników uszkodzenia nerek przebiegu cukrzycy (ACR i GFR), które u badanych dzieci mieściły się w normie. Co istotne, różnice te obserwowano już w ciągu pierwszych pięciu lat trwania CT1 oraz u chorych o zalecanym wyrównaniu metabolicznym cukrzycy. Natomiast do znamiennego wzrostu ACR i  $\text{GFR}_F$  dochodziło dopiero u dzieci wykazujących złą kontrolę glikemiczną (HbA1c powyżej 10%). Wartości

ACR i  $GFR_F$  wykazywały dodatnią zależność ze stężeniem HbA1c. U 31% chorych stwierdzono wystąpienie zjawiska hiperfiltracji ( $GFR_F > 135 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ). Zauważono, że hiperfiltracja wpływa na stężenia sNGAL, uNGAL i uKatep, bez wpływu na wartości uRBP, uznanego za cewkowego markera uszkodzenia nerek. Z kolei stwierdzenie dodatniej zależności pomiędzy stężeniami uNGAL i uRBP wskazuje na podobny mechanizm uszkodzenia nerek prowadzący do wzrostu tych wskaźników. Elementem łączącym jest tzw. cewkowa hipoteza rozwoju hiperfiltracji, która zakłada, że przyczyną hiperfiltracji jest wzmoczona reabsorbcja sodu w zmienionych przez cukrzycę cewkach proksymalnych. U chorych stwierdzono ujemną zależność pomiędzy uNa i  $GFR_F$  oraz pomiędzy uNa i HbA1c, co wskazuje na zależne od kontroli glikemicznej stężenie uNa i zależną od zawartości sodu w moczu wartość  $GFR_F$ . W grupie dzieci o najniższych stężeniach uNa stwierdzono najwyższe wartości uNGAL, uRBP, uKatep, ACR,  $GFR_F$ , Chol<sub>c</sub> i TG. Wartości badanych markerów uszkodzenia nerek ulegały wzrostowi zanim doszło do znamiennej zmiany stężenia uNa. Uzyskane wyniki wspierają cewkową hipotezę rozwoju hiperfiltracji w przebiegu CT1. Według niej, na skutek uszkodzenia cewek proksymalnych dochodzi do zmiany stężenia wczesnych markerów uszkodzenia nerek, a następnie na skutek utrzymującej się hiperglikemii dochodzi do wzrostu reabsorbcji glukozy i sodu w cewkach proksymalnych. Objawia się to zmniejszeniem stężenia uNa, wzrostem  $GFR$  i dalszą zmianą stężenia badanych markerów uszkodzenia nerek oraz wzrostem dotychczasowych (ACR). Uzyskane wyniki sugerowałyby użycie również uNa jako wczesnego markera CChN.

Ponadto stwierdzono, że dzieci z ACR powyżej 15mg/g wykazywały cechy gorszego wyrównania metabolicznego (wzrost HbA1c) oraz zwiększone ryzyko uszkodzenia nerek (wzrost uNGAL,  $GFR_F$ , uNa i Chol<sub>c</sub>). Dodatnia zależność pomiędzy stężeniami ACR i uNGAL potwierdza potencjalne możliwości użycia uNGAL jako markera CChN.

Stwierdzono także, że stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy jest gorszy u dziewczynek, co prowadzi do większego uszkodzenia nerek wyrażonego znacząco wyższym stężeniem uNGAL, ACR,  $GFR_F$ , uNa i Chol<sub>c</sub>. Nie wykazano związku pomiędzy czasem trwania cukrzycy i metody stosowanej terapii a wystąpieniem powikłań nerkowych. Nie stwierdzono także znamienych różnic w stężeniu sIL-18, uIL-18, uANG, uFABP u chorych z CT1 w porównaniu do dzieci zdrowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski: <sup>1</sup>U dzieci z cukrzycą typu 1 wczesne uszkodzenie nerek, definiowane jako zmiana stężenia sNGAL, uNGAL, uRBP oraz uKateps, występuje nawet u chorych z dobrym wyrównaniem metabolicznym cukrzycy. Uszkodzenie to jest największe u dzieci ze złą kontrolą glikemii. <sup>2</sup>Uszkodzenie nerek u dzieci z cukrzycą typu 1 definiowane w oparciu o badane markery, pojawia się już w ciągu pierwszych pięciu lat trwania choroby. <sup>3</sup>U dzieci z cukrzycą typu 1 bez mikroalbuminurii i obniżonej wartości  $GFR_F$  nie stwierdza się zmian w zakresie stężenia sIL-18, uIL-18, uAGT, uFABP. <sup>4</sup>Mechanizm wczesnego uszkodzenia nerek może być związany ze zmniejszonym stężeniem sodu w moczu i ze zjawiskiem hiperfiltracji. <sup>5</sup>Płeć żeńska stanowi grupę ryzyka złej kontroli metabolicznej cukrzycy. <sup>6</sup>Wskazane jest rozważenie obniżenia progu rozpoznawania mikroalbuminurii u dzieci do wartości wskaźnika albuminowo-kreatyninowego wynoszącego 15mg/g.

## 8 SUMMARY

Diabetic kidney disease (DKD) is one of the most common complications of both, type 1 (DMT1) and type 2 (DMT2) diabetes, and is a major cause of end stage renal disease (ESRD) in adult patients. Early detection of kidney damage in children with diabetes is of great importance in terms of the effectiveness of treatment and prevention of the development of life-threatening complications.

The aim of this study was to evaluate early kidney damage in children with DMT1 with a new markers in serum and urine, such as neutrophil gelatinase-associated lipocalin (sNGAL and uNGAL), interleukin-18 (sIL-18 and uIL-18), retinol binding protein (uRBP), cathepsin (uKatep), angiotensinogen (uANG) and fatty acid binding protein (uFABP). To assess the potential mechanisms of early kidney damage, following factors were analyzed: glomerular filtration rate (GFR), the degree of metabolic control, the concentration of sodium in the urine (uNa), time of duration of diabetes, urinary albumin excretion, gender and the method of insulin treatment.

Sixty-three children (35 girls and 28 boys) suffering from DMT1, aged from 4.6 to 17.9 years were included into the study. The mean duration of the disease was  $5,16 \pm 3,39$  years. In all children, DKD as well as other diseases that could affect the results, were excluded. All children showed normoalbuminuria ( $\leq 30\text{mg/g}$ ) and normal GFR ( $\geq 90\text{ml/min/1,73m}^2$ ). For the evaluation of urinary albumin excretion rate, albumin/creatinine ratio (ACR) was measured. GFR was calculated using Filler formula ( $\text{GFR}_F$ ) based on the cystatin C concentration. The glycemic control was assessed by glycated hemoglobin (HbA1c) concentration. The control group comprised of 22 healthy children of the similar age.

Children with DMT1 showed significantly higher levels of uNGAL and uRBP and lower sNGAL and uKatep with respect to controls. These abnormalities preceded any significant changes of commonly used biomarkers of renal damage, i.e. increase of ACR and the reduction of GFR. These changes were observed even in children treated less than 5 years and with good glycemic control. Significant increase in ACR and  $\text{GFR}_F$  was observed among children with the worst glycemic control (HbA1c  $>10\%$ ). The positive correlation between HbA1c and ACR, as well as HbA1c and  $\text{GFR}_F$  was found. In 31% of patients showed the glomerular hyperfiltration ( $\text{GFR}_F >135\text{ml/min/1,73m}^2$ ), which affected the levels of sNGAL,



uNGAL and uKatep, without changes in uRBP – recognized as a tubular biomarker. The positive correlation between uRBP and uNGAL may indicate the common pathways of kidney damage leading to the increase of these markers. It was found, that uNa showed negative correlation with  $GFR_F$ , as well as with HbA1c. In the group of children with the lowest level of uNa, the highest values of uNGAL, uRBP, uKatep, ACR,  $GFR_F$ , Cholc and TG were found. New biomarkers changed before decrease of uNa. These results suggest the close relation between the glycemic control and impaired sodium handling in renal tubules and may support the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in children with diabetes. These tubular injury may lead to early changes of new markers of kidney injury. Persistent hyperglycemia and poor metabolic control contribute to increased sodium reabsorption in the proximal tubules, resulting in the decrease in uNa levels, which, in consequence, may lead to the increase in GFR and a further change in the concentrations of new markers of kidney damage. These results may indicate uNa as a potential marker of DKD. It was also found that children with ACR above 15mg/g showed a worse glycemic control (increase in HbA1c) and an increased risk of kidney damage (increase uNGAL,  $GFR_F$ , uNa and Chol<sub>c</sub>). A positive correlation between the concentrations of ACR and uNGAL confirms the potential use uNGAL as a marker of DKD.

It was also found, that girls showed worse glycemic control and significantly higher concentration of uNGAL, ACR,  $GFR_F$ , uNa i Chol<sub>c</sub>. There were no relations both between duration time of diabetes and treatment modality and between the early biomarkers of kidney injury. There were no significant differences in concentrations of sIL-18, uIL-18, uANG, uFABP in patients with DMT1 compared to healthy children.

Conclusions: <sup>1</sup>In children with type 1 diabetes early kidney damage, defined as a changes in the levels of sNGAL, uNGAL, uRBP, uKateps occurs in patients with good metabolic control of diabetes. This damage is the greatest in children with poor glycemic control. <sup>2</sup>Kidney damage in children with type 1 diabetes defined as a changes in the levels of studied biomarkers may take place during the first five years of the disease. <sup>3</sup>There are no changes in the levels of sIL-18, uIL-18, uAGT, uFABP in children with type 1 diabetes without microalbuminuria and reduced  $eGFR_F$ . <sup>4</sup>The mechanism of early kidney damage may be associated with reduced sodium concentration in urine and the glomerular hyperfiltration. <sup>5</sup>Female sex is a risk factor of poor glycemic control in diabetic children. <sup>6</sup>Significant MA in children with DMT1 should be recognized earlier e.g. above 15mg/g.

## 9 SPIS TABEL

Tabela 1. Prawdopodobieństwo wystąpienia CChN w zależności od GFR i albuminurii. ...	7
Tabela 2. Rodzaje wyrównania metabolicznego cukrzycy w zależności od stężenia HbA1c wg zaleceń ISPAD .....	12
Tabela 3. Definicje albuminurii i proteinurii w zależności od metody oznaczania.....	15
Tabela 4. Interpretacja wyniku GFR.....	18
Tabela 5. Wzór Schwartza służący do oceny GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> ) u dzieci .....	19
Tabela 6. Podstawowe dane charakteryzujące grupę badaną i kontrolną.....	30
Tabela 7. Porównanie wyników badań laboratoryjnych między grupą badaną i kontrolną.....	34
Tabela 8. Wyniki pozostałych badań laboratoryjnych w grupie badanej .....	35
Tabela 9. Wartości sNGAL i uNGAL w grupie badanej i kontrolnej .....	35
Tabela 10. Różnice uRBP i uKatep pomiędzy grupą badaną i kontrolną.....	36
Tabela 11 Różnice sIL-18, uIL-18, uAGT i uFABP pomiędzy grupą badaną i kontrolną.....	37
Tabela 12. Porównanie wybranych parametrów w obrębie grupy badanej oraz między grupą badaną i kontrolną w zależności od zakresu GFR <sub>F</sub> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> ).....	39
Tabela 13. Porównanie wybranych parametrów w obrębie grupy badanej oraz między grupą badaną i kontrolną w zależności od zakresu HbA1c (%). .....	43
Tabela 14. Porównanie wybranych parametrów w obrębie grupy badanej oraz między grupą badaną i kontrolną w zależności od zakresu uNa (mmol/l).....	47
Tabela 15. Porównanie wybranych parametrów w obrębie grupy badanej oraz między grupą badaną i kontrolną w zależności od czasu trwania CT1 (lata).....	50
Tabela 16. Porównanie grupy badanej w zależności od stężenia ACR .....	53
Tabela 17. Porównanie grupy badanej w zależności od stosowanej terapii .....	54
Tabela 18. Porównanie wartości biomarkerów oraz innych badań laboratoryjnych pomiędzy chłopcami i dziewczynkami w obrębie grupy badanej .....	55
Tabela 19. Porównanie wybranych parametrów laboratoryjnych dziewczynek i chłopców wykazujących podobny odsetek HbA1c (7,29±1,06 vs 7,79±1,93; p = 0,251740).....	57
Tabela 20. Zależności pomiędzy badanymi biomarkerami a innymi parametrami laboratoryjnymi w grupie badanej .....	58
Tabela 21. Zależności pomiędzy dotychczasowymi markerami uszkodzenia nerek i pozostałymi parametrami ocenianymi w obrębie grupy badanej .....	61
Tabela 22. Zależności pomiędzy czynnikami ryzyka rozwoju DN a pozostałymi oznaczanymi parametrami .....	62
Tabela 23. Zależności uzyskane u chorych o wartościach GFR <sub>F</sub> >135ml/min/1,73m <sup>2</sup> .....	65
Tabela 24. Zależności uzyskane w grupie badanej o wartościach GFR <sub>F</sub> ≤ 135ml/min/1,73m <sup>2</sup> i w grupie kontrolnej .....	65

## 10 SPIS RYCIN

Rycina 1. Mechanizmy mogące prowadzić do uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy (za Ziyadeh i Wolf [31]).	10
Rycina 2. Proponowany patomechanizm degradacji albumin w komórce cewki proksymalnej nefronu [82].	17
Rycina 3. Graficzne przedstawienie różnic sNGAL i uNGAL pomiędzy grupą badaną i kontrolną	36
Rycina 4. Różnice uRBP i uKatep pomiędzy grupą badaną i kontrolną	36
Rycina 5. Porównanie sNGAL, uNGAL, uRBP, uKatep, HbA1c i ACR w zależności od wartości $GFR_F$ (ml/min/1,73m <sup>2</sup> ): „0” – $GFR_F \leq 120$ ; „1” – $120 < GFR_F \leq 135$ ; „2” – $GFR_F > 135$	41
Rycina 6. Porównanie sNGAL, uNGAL, uRBP, czasu trwania CT1, $GFR_{Sch}$ i ACR w zależności od HbA1c; „0” – $HbA1c \leq 6,5\%$ ; „1” – $6,5\% < HbA1c \leq 8\%$ ; „2” – $8\% < HbA1c \leq 10\%$ ; „3” – $HbA1c > 10\%$	45
Rycina 7. Porównanie sNGAL, uNGAL, uRBP, uKatep, HbA1c i $GFR_F$ w zależności od zakresu uNA (mmol/l) „0” – $uNa \leq 60$ ; „1” – $60 < uNa \leq 150$ ; „2” – $uNa > 150$	48
Rycina 8. Porównanie sNGAL, uNGAL, uRBP, uKatep, $GFR_{Sch}$ i ACR w zależności od czasu trwania CT1 (lata); „0” – $Cz.T.CT1 \leq 5lat$ ; „1” – $5lat < Cz.T.CT1 \leq 10lat$ ; „2” – $Cz.T.CT1 > 10lat$	51
Rycina 9. Zależność pomiędzy wartościami uNGAL i ACR	59
Rycina 10. Zależność pomiędzy wartościami uRBP i uNGAL	60
Rycina 11. Zależność pomiędzy wartościami ACR i HbA1c	63
Rycina 12. Zależność pomiędzy wartościami uNA i HbA1c	64
Rycina 13. Proponowana hipoteza wczesnego uszkodzenia nerek w przebiegu CT1	72

---

## 11 PIŚMIENNICTWO

1. Reutens AT, Atkins RC. Epidemiology of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol.* 2011;170:1-7.
2. Czekański S. Cukrzycowa choroba nerek. W: Myśliwiec M (red). *Wielka Interna.* Warszawa, Medical Tribune Polska. 2009;1:180-197.
3. Atkins R.C, Zimmet P. Diabetic kidney disease: act now or pay later. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25:181–184.
4. Majkowska L, Czekański S. Cukrzyca. W: Januszewicz W, Kokot F (red). *Interna.* Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 3; 1089-1133.
5. Craig ME, Hattersley A, Donaghue KC. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2009 Compendium. Pediatric Diabetes* 2009; 103–12.
6. Jarosz-Chobot P, Otto-Buczowska E. Epidemiologia cukrzycy typu 1. *Przeg. Ped.* 2009;39;4:229-234.
7. Bogdanović R. Diabetic nephropathy in children and adolescents. *Pediatr Nephrol.* 2008;2:507–525.
8. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2007;49: S1–S245.
9. Hogg R, Furth S, Lemley K i in. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease in Children and Adolescents: Evaluation, Classification, and Stratification. *Pediatrics.* 2003Jun;111:1416- 421
10. Mathiesen ER, Ronn B, Storm B i in. The natural course of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus. A 10 year prospective study. *Diabet Med.* 1995;12:482–487.
11. Mogensen CE. How to protect the kidney in diabetic patients with special references to IDDM. *Diabetes.* 1997; 46:104–111.
12. Dahlquist G, Stattin EL, Rudberg S. Urinary albumin excretion rate and glomerular filtration rate in the prediction of diabetic nephropathy; a longterm follow-up study of childhood onset type-1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:1382–1386.

13. Amin R, Turner C, van Aken S i in. The relationship between microalbuminuria and glomerular filtration rate in young type 1 diabetic subjects: The oxford regional prospective study. *Kidney Int.* 2005;68:1740–1749.
14. Chiarelli F, Verrotti A, Morgese G. Glomerular hyperfiltration increases the risk of developing microalbuminuria in diabetic children. *Pediatr Nephrol.* 1995;9:154–158.
15. Zerbini G, Bonfanti R, Meschi F i in. Persistent renal hypertrophy and faster decline of glomerular filtration rate precede the development of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55:2620–2625.
16. Hovind P, Tarnow L, Rossing K i in. Decreasing incidence of severe diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26:1258–1264.
17. Skrivarhaug T, Bangstad HJ, Stene LC i in. Low risk of overt nephropathy after 24 yr of childhood-onset type 1 diabetes mellitus (T1DM) in Norway. *Pediatr Diabetes.* 2006;7:239–246.
18. Czekalski S. Nefropatia cukrzycowa czy cukrzycowa choroba nerek? *Forum Nefrologiczne.* 2008;1; nr 2: 53–56.
19. Steffes MW, Osterby R, Chavers B i in. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes.* 1989;38:1077–1081.
20. Osterby R. Glomerular structural changes in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: causes, consequences and prevention. *Diabetologia.* 1992;35:803–812.
21. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813–820.
22. Forbes JM, Cooper ME. Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007;115: 69-84.
23. Chen S, Wolf G, Ziyadeh FN. The renin-angiotensin system in diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol.* 2001;135: 212-21.
24. Van der Zee R, Murohara T, Luo Z. i in. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation.* 1997;95:1030-7.

25. Sharma K, Deelman L, Madesh M, i in. Involvement of transforming growth factor-beta in regulation of calcium transients in diabetic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285: F1258-70.
  
26. Chawla T, Sharma D, Singh A. Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy. *World J Diabetes*. 2010;15; 1: 141-145.
  
27. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M i in. Renin-angiotensin system and renal damage: emerging data on angiotensin II as a proinflammatory mediator. *Contrib Nephrol* 2001;135:123-137.
  
28. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Ruperez M, i in. Renal and vascular hypertension- induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hyperten*. 2006; 15: 159-66.
  
29. Satchell SC, Tooke JE: What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia* 2008;51:714–725.
  
30. Gnudi L. Molecular mechanisms of proteinuria in diabetes. *Biochem Soc Trans*. 2008;36:946–949.
  
31. Ziyadeh F, Wolf G . Pathogenesis of the Podocytopathy and Proteinuria in Diabetic Glomerulopathy. *Current Diabetes Reviews*. 2008; 4, 39-45.
  
32. Thomson SC, Vallon V, Blantz RC. Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 286: F8-15.
  
33. Vallon V, Blantz RC, Thomson SC. Glomerular hyperfiltration and the salt paradox in early type 1 diabetes mellitus: a tubulo-centric view. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:530 –537.
  
34. Persson P, Hansell P, Palm F. Tubular reabsorption and diabetes-induced glomerular hyperfiltration. *Acta Physiol*.2010; 200:3–10.
  
35. O’Bryan GT, Hostetter TH. The renal hemodynamic basis of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 1997; 17:93–100.
  
36. Hostetter TH. Hypertrophy and hyperfunction of the diabetic kidney. *J Clin Invest*. 2001;107:161–162.
  
37. Vallon V, Blantz R, Thomson S. The salt paradox and its possible implications in managing hypertensive diabetic patients. *Curr Hypertens Rep*. 2005;7:141-7.

38. DCCT Research Group. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Control and Complications Trial. J Pediatr.* 1994;125:177–188.
39. DCCT Research Group. The effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the diabetes control and complications trial. *Kidney Int.* 1995; 47:1703–1720.
40. DCCT/EDIC Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med.* 2000; 342:381–389.
41. DCCT Research Group. The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the diabetes control and complications trial *Diabetes.* 1996; 45:1289–98.
42. Krolewski AS, Laffel LM, Krolewski M i in. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1995;332:1251–1255.
43. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2009 Compendium Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with diabetes. *Pediatric Diabetes.* 2009; 10: 71–81.
44. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2011. *Diabetologia Praktyczna.* 2011; tom 12, supl. A.
45. The diabetes control and complications trial research group. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: *Diabetes Control and Complications Trial. Pediatric Diabetes.* 2009; 10: 71–81.
46. The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of longterm complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.*1993;329: 977–986.
47. Zhang L, Krzentowski G, Albert A i in. Factors predictive of nephropathy in DCCT type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. *Diabet Med.* 2003;20:580–585.
48. Rudberg S, Ullman E, Dahlquist G. Relationship between early metabolic control and the development of microalbuminuria - a longitudinal study in children with type-1 (insulindependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1993; 36:1309–1314.

49. Raile K, Galler A, Hofer S i in. Diabetic nephropathy in 27,805 children, adolescents and adults with type 1 diabetes: effect of diabetes duration, HbA1c, hypertension, dyslipidemia, diabetes onset and gender. *Diabetes Care*. 2007;30:2523-2528.
50. Twyman S, Rowe D, Mansell P i in. Longitudinal study of urinary albumin excretion in young diabetic patients—Wessex diabetic nephropathy project. *Diabet Med*. 2001;18:402–408.
51. Sochett E, Daneman D. Early diabetes-related complications in children and adolescents with type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999;128:865–882.
52. Kostraba JN, Dorman JS, Orchard TJ i in. Contribution of diabetes duration before puberty to development of microvascular complications in IDDM subjects. *Diabetes Care*. 1989;12:686–693.
53. Svensson M, Eriksson JW, Dahlquist G. Early glycemie control, age at onset, and development of microvascular complications in childhood-onset type diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27:955–962.
54. Donaghue KC, Fairchild JM, Craig ME i in. Do all prepubertal years of diabetes duration contribute equally to diabetes complications? *Diabetes Care*. 2003;26:1224–1229.
55. Rich SS. Genetics of diabetes and its complications. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:353–360.
56. Caramori ML, Mauer M. Diabetes and nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12:273–282.
57. Rippin JD, Patel A, Bain SC. Genetics of diabetic nephropathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2001;15:345–358.
58. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B i in. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type I diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:541–549.
59. Penno G, Chaturvedi N, Talmud PJ i in. Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on progression of renal disease and the influence of ACE inhibition in IDDM patients. *Diabetes*. 1998;47:1507–1511.
60. Hovind P, Tarnow L, Rossing P i in. Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *BMJ*. 2004;328:1105–1109.



61. Microalbuminuria Collaborative Study Group. Predictors of the development of microalbuminuria in patients with type 1 diabetes mellitus: a seven-year prospective study. *Diabet Med.* 1999;16:918–925.
62. Mortensen HB, Marinelli K, Norgaard K i in. A nation-wide crosssectional study of urinary albumin excretion rate, arterial blood pressure and blood glucose control in Danish children with type 1 diabetes mellitus. Danish Study Group on Diabetes in Childhood. *Diabet Med.* 1990;7:887–897.
63. Lurbe E, Sorof JM, Daniels SR. Clinical and research aspects of ambulatory blood pressure monitoring in children. *J Pediatr.* 2004; 144:7–16.
64. Stone ML, Craig ME, Chan AK i in. Natural history and risk factors for microalbuminuria in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29:2072–2077.
65. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH i in. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2003;348:2285–2293.
66. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-2007. *Pediatric Diabetes.* 2006;7: 352–360.
67. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2009 Compendium. Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes* 2009;10: 195–203.
68. Ochodnický P, Henning RH, van Dokkum RP i in. Microalbuminuria and endothelial Dysfunction: Emerging Targets for Primary Prevention of End-organ Damage. *Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47 Suppl 2:S151-62.
69. Christiansen RE, Tenstad O, Leh S i in. Glomerular charge selectivity is impaired in hypertensive nephropathy. *Nephrol Dial. Transplant.* 2004;19: 1083-91.
70. Redon J. Measurement of microalbuminuria – what the nephrologist should know. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21: 573–576.
71. Lewandowicz A. Mikroalbuminuria wciąż fascynujące zagadnienie. *Kardiologia na co Dzień.* 2009;4:3–8.
72. Adler S. Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1165-72.

73. Zeisberg M, Ericksen MB, Hamano Y i in. Differential expression of type IV collagen isoforms in rat glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295: 401-7.
74. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S i in. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1997; 99: 342-8.
75. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia.* 1999; 42:1341-4.
76. Vestra MD, Masiero A, Roiter AM i in. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52: 1031-5.
77. Pätäri A, Forsblom C, Havana M i in. Nephriuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52: 2969-74.
78. Lanham RG, Kelly DJ, Cox AJ i in. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia.* 2002; 45: 1572-6.
79. Lim SC, Caballero AE, Smakowski P i in. Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. *Diabetes Care.* 1999;22:1865–1870.
80. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG i in. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes - the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia.* 2005; 48: 370–378.
81. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;14;340:115-26.
82. Comper WD, Russo LM. Where does albuminuria come from in diabetic kidney disease? *Curr Diab Rep.* 2008; 8: 477-85.
83. Gekle M. Renal proximal tubular albumin reabsorption: daily prevention of albuminuria. *News Physiol Sci.* 1998; 13: 5-11.
84. Russo LM, Sandoval RM, McKee M i in. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int* 2007; 71: 504-13.

85. Gekle M. Renal albumin handling: a look at the dark side of the filter. *Kidney Int* 2007; 71: 479-81.
86. Schenk O, Ling H, Sebekova K i in. High glucose media enhance the responsiveness of tubular cells to growth promoters: effect on lysosomal cathepsins and protein degradation. *Miner Electrolyte Metab.* 1998, 24:254–260.
87. Sochett E, Daneman D. Early diabetes-related complications in children and adolescents with type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1999;128:865–882.
- 88 Schultz CJ, Konopelska-Bahu T, Dalton RN i in. Microalbuminuria prevalence varies with age, sex, and puberty in children with type 1 diabetes followed from diagnosis in a longitudinal study. Oxford Regional Study Group. *Diabetes Care.* 1999; 22:495–502.
89. Holl W, Grabert M, Thon A i in. Urinary excretion of albumin in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 1999;22:1555–1560.
90. Svensson M, Eriksson JW, Dahlquist G. Early glycemic control, age at onset, and development of microvascular complications in childhood-onset type diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27:955–962.
91. Gallego PH, Bulsara MK, Frazer F i in. Prevalence and risk factors for microalbuminuria in a population-based sample of children and adolescents with T1DM in Western Australia. *Pediatr Diabetes.* 2006;7:165–172.
92. Svensson M, Nystrom L, Schon S i in. Age at onset of childhood-onset type 1 diabetes and the development of end-stage renal disease. *Diabetes Care.* 2006; 29:538–542.
93. Lawson ML, Sochett EB, Chait PG i in. Effect of puberty on markers of glomerular hypertrophy and hypertension in IDDM. *Diabetes.* 1996;45:51–55.
94. Barkai L, Vamosi I, Lukacs K. Enhanced progression of urinary albumin excretion in IDDM during puberty. *Diabetes Care.* 1998;21:1019–1023.
95. Lane PH. Diabetic kidney disease: impact of puberty. *Am J Physiol.* 2002;283:589–600.
96. Amin R, Schultz C, Ong K i in. Low IGF-I and elevated testosterone during puberty in subjects with type 1 diabetes developing microalbuminuria in comparison to normoalbuminuric control subjects. *Diabetes Care.* 2003; 26:1456–1461.

97. Amin R, Williams RM, Frystyk J i in. Increasing urine albumin excretion is associated with growth hormone hypersecretion and reduced clearance of insulin in adolescents and yAKIg adults with type 1 diabetes: The Oxford Regional Prospective Study. *Clin Endocrinol.* 2005; 62:137–144.
98. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM i in. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics.* 1976;58:259–263.
99. Schwartz GJ, Feld LG, Langford DJ. A simple estimate of glomerular filtration rate in full-term infants during the first year of life. *J Pediatr.*1984;104:849–854.
100. Schwartz GJ, Gauthier B. A simple estimate of glomerular filtration rate in adolescent boys. *J Pediatr.* 1985;106:522–526.
101. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF i in. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:629-637.
102. Stevens LA, Lafayette RA, Perrone RD i in. Laboratory evaluation of kidney function. *Diseases of the Kidney and Urinary Tract.* 8th edn. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2007;299-336.
103. Star RA. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int.*1998;54:1817e31.
104. Seikaly MG, Browne R, Bajaj G i in. Limitations to body length/serum creatinine ratio as an estimate of glomerular filtration rate in children. *Pediatr Nephrol.* 1996;10:709–711.
105. Lofberg H, Grubb A. Quantitation of g trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand J Clin Lab Invest* 1979;39:619e26.
106. Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C (gamma trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest.*1985;45:97e101.
107. Westhuyzen J. Cystatin C: a promising marker and predictor of impaired renal function. *Ann Clin Lab Sci.* 2006;36:387e94.
108. Jacobsson B, Lignelid H, Bergerheim US. Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers for renal cell carcinomas. *Histopathology* 1995;26:559e64.
109. Grubb AO. Cystatin C properties and use as diagnostic marker. *Adv Clin Chem.* 2000;35:63e99.

110. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta analysis. *Am J Kidney Dis.* 2002;40:221e6.
111. Roos JF, Doust J, Tett SE i in. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children e a meta analysis. *Clin Biochem* 2007;40:383e91.
112. Macisaac RJ, Tsalamandris C, Thomas MC i in. The accuracy of cystatin C and commonly used creatinine based methods for detecting moderate and mild chronic kidney disease in diabetes. *Diabet Med.* 2007;24:443-8.
113. Filler G, Lepage N. Should the Schwartz formula for estimation of GFR be replaced by cystatin C formula? *Pediatr Nephrol.* 2003; Oct;18:981-5.
114. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J i in. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.* 2004;66:1115–1122.
115. VandeVoorde RG, Katlman TI, Ma Q i in. Serum NGAL and cystatin C as predictive biomarkers for acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17:404A.
116. Pucci L, Triscornia S, Lucchesi D i in. Cystatin C and estimates of renal function: searching for a better measure of kidney function in diabetic patients. *Clin Chem.* 2007;53:480-8.
117. Premaratne E, Macisaac RJ, Panagiotopoulos S i in. Serial measurements of cystatin C are more accurate than creatinine based methods in detecting declining renal function in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2008;31:971-3.
118. Hyla-Klekot L, Kokot F. Biomarkery uszkodzenia nerek. *Postępy Nauk Medycznych.* 2009; 1: 28-33.
119. Haase M, Bellomo R, Devarajan P i in. NGAL Meta analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;54:1012-24.
120. D. Bolignano, V. Donato, G. Coppolino i in. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am. J. Kidney Dis.* 2008;52, 595–605.
121. Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics.* 1997;45:17–23.

122. Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000;482:298–307.
123. Vaidya V, Ferguson M, Bonventre J. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008;48:463–93.
124. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY i in. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:407–413.
125. Edelstein. Ch. Biomarkers in kidney disease. Academic Press is an imprint of Elsevier. Wydanie pierwsze 2011.
126. Mishra J, Mori K, Ma Q i in. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15:3073–3082.
127. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med*. 2010; 4:265–280.
128. Yang J, Goetz D, Li JY i in. Aniron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*. 2002;10:1045–1056.
129. Goldstein S, Devarajan P. Acute kidney injury in childhood: should we be worried about progression to CKD? *Pediatr Nephrol*. 2011; 26:509-22.
130. Wagener G, Jan M, Kim M i in. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology*. 2006; 105: 485-491.
131. Mishra J, Ma Q, Kelly C i in. Kidney NGAL is a novel marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol*. 2006; 21: 856-863.
132. Parikh CR, Jani A, Mishra J i in. Urine NGAL and Il-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006; 6: 1639-1645.
133. Mori K, Lee HT, Rapoport D i in. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005;115:610–621.
134. Mishra J, Dent C, Tarabishi R i in. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury following cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365:1231–1238.
135. Hirsch R, Dent C, Pfrim H. NGAL is an early predictive biomarker of kontrast – induced nephropathy in children. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:2089-95.

136. Suzuki M, Wiers K, Klein-Gitelman M i in. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of disease activity in pediatric lupus nephritis. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23:403–412.
137. Bolignano D, Coppolino G, Campo S i in. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2007; 27:373–378.
138. Bolignano D, Coppolino G, Campo S i in. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23:414–416.
139. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G i in. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin reflects the severity of renal impairment in subjects affected by chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2008;31:255–258.
140. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G i in. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press Res.* 2009; 32:91–98.
141. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M i in. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney International.* 2009;75, 285–294.
142. Manal A. Fathy, Manal M. Elkady, Hanan A. Fathy i in. Estimation of Renal Tubular Markers for Predicting Early Stage Diabetic Nephropathy in Egyptian Children with Type I Diabetes Mellitus. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences.* 2009;4:207-211, 2009.
143. Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH, Bonventre JV. Noninvasive renal diagnostic studies. *Clin. Lab. Med.* 1988; 8:507–26.
144. Bernard AM, Vyskocil AA, Mahieu P i in. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. *Clin. Chem.* 1987;33:775–79.
145. Garcon G, Leleu B, Zerimech F i in. Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium. *J. Occup. Environ. Med.* 2004; 46:1180–6.
146. Turk V, Turk B, Guncar G i in. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul.* 2002;42: 285–303.

147. Berdowska I: Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta*. 2004; 342: 41–69.
148. Eijan AM, Sandes E, Puricelli L i in. Cathepsin B levels in urine from bladder cancer patients. *Oncol Rep* 2000; 7: 1395–99.
149. Staack A, Koenig F, Daniltchenko D i in. Cathepsins B, H, and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2002; 59: 308–12.
150. Senatorski G, Pączek L, Sułowicz w i in. Urine activity of cathepsin B, collagenase and urine excretion of TGF- $\beta$ 1 and fi bronectin in membranous glomerulonephritis. *Res Exp Med*. 1998; 198: 199–206.
151. Schaefer L, Gilge U, Heidland A i in. Urinary excretion of cathepsin B and cystatins as parameters of tubular damage. *Kidney Int*.1994; 46: S64–67.
152. Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Fus I i in. Urinary activities of cathepsin B, N-acetyl-b-D-glucosaminidase, and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit*, 2006; 12: CR210-214.
153. Osicka TM, Houlihan CA, Chan JG i in. Albuminuria in patients with type 1 diabetes is directly linked to changes in the lysosome-mediated degradation of albumin during renal passage. *Diabetes*, 2000; 49: 1579–84.
154. Kistler A, Peev V, Forst A i in. Enzymatic disease of the podocyte. *Pediatr Nephrol*. 2010; 25:1017–1023.
155. Sever S, Altintas MM, Nankoe SR i in. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest*. 2007; 117:2095–2104.
156. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M i in. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol* . 2005;16:3046–3052.
157. Parikh CR, Jani A, Mishra J i in. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006; 6:1639–1645.
158. Parikh CR, Jani A, Melnikov VY i in. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis*. 2004; 43:405–414.



159. Ingelfinger JR, Pratt RE, Ellison K i in. Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *J Clin Invest.* 1986;78:1311–1315.
160. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local reninangiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006; 86: 747-803.
161. Erdös EG. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am J Med.* 1976; 60: 749-759.
162. Casarini DE. Upregulation of intrarenal angiotensinogen in diabetes. *Hypertens Res.* 2010;33:1106-7.
163. Wolf G, Mueller E, Stahl RA i in. Angiotensin II induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor beta. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1366-1372.
164. Rogus JJ, Moczulski D, Freire MB i in. Diabetic nephropathy is associated with AGT polymorphism T235: results of a family-based study. *Hypertension.* 1998; 31: 627-631.
165. Urushihara M, Kondo S, Kagami S i in. Angiotensinogen Accurately Reflects Intrarenal Renin-Angiotensin System Activity. *Am J Nephro.* 2010;31:318-325.
166. Yamamoto T, Nakagawa T, Suzuki H i in. Urinary Angiotensinogen as a Marker of Intrarenal Angiotensin II Activity Associated with Deterioration of Renal Function in Patients with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 1558-1565.
167. Kobori H, Nishiyama A, Lisa M i in. Urinary Angiotensinogen as an Indicator of Intrarenal Angiotensin Status in Hypertension. *Hypertension.* 2003, 41:42-49.
168. Koboria H, Urushiharaa M, Xub J i in. Urinary angiotensinogen is correlated with blood pressure in men (Bogalusa Heart Study). *J Hypertens.* 2010; Jul;28:1422-8.
169. Saito T, Urushihara M, Kotani Y i in. Increased urinary angiotensinogen is precedent to increased urinary albumin in patients with type 1 diabetes. *Am J Med Sci.* 2009;338:478-80.
170. Glatz JF, Van Der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog. Lipid. Res.* 1996;35:243–82.
171. Maatman RG, van de Westerlo EM, van Kuppevelt TH i in. Molecular identification of the liver- and the heart-type fatty acid-binding proteins in human and rat kidney. Use of the reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Biochem. J.* 1992;288:285–90.

172. Maatman RG, Van Kuppevelt TH, Veerkamp JH. Two types of fatty acid-binding protein in human kidney. Isolation, characterization and localization. *Biochem. J.* 1991;273:759–766.

173. Sweetser DA, Heuckeroth RO, Gordon JI. The metabolic significance of mammalian fatty-acid-binding proteins: abundant proteins in search of a function. *Annu. Rev. Nutr.* 1987; 7:337–359.

174. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Obama A i in. Liver-type fatty acid-binding protein attenuates renal injury induced by unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol.* 2006; 169:1107–1117.

175. Portilla D, Dent C, Sugaya T i in. Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int.* 2008; 73:465–472.

176. Ferguson MA, Vaidya VS, Waikar SS i in. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int.* 2010; 77:708–714.

177. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A i in. Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem.* 2006; 284:175–182.

178. Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y i in. Effect of pitavastatin on urinary liver-type fatty acid-binding protein levels in patients with early diabetic nephropathy. *Diab Care.* 2005; 28:2728–2732.

179. Marre M, Hallab M, Roy J i in. Glomerular hyperfiltration in type 1, and type 2, and secondary diabetes. *J. Diab. Compl.* 1992;6:19-24.

180. Urbina E, Alpert B, Flynn J i in. Ambulatory Blood Pressure Monitoring in Children and Adolescents: Recommendations for Standard Assessment. *Hypertension.* 2008;52:433-451.

181. Marshall W.A, Tanner J.M. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child.* 1969;44:291-303.

182. Marshall W.A, Tanner J.M. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child.* 1970;45:13-23.

183. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89-95.

184. Devarajan P. Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 2007;27:637-51.

185. Schultz CJ, Konopelska-Bahu T, Dalton RN i in. Microalbuminuria prevalence varies with age, sex, and puberty in children with type 1 diabetes followed from diagnosis in a longitudinal study. Oxford Regional Study Group. *Diabetes Care*. 1999; 22:495–502.
186. Jones CA, Leese GP, Kerr S i in. Development and progression of microalbuminuria in a clinic sample of patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Arch Dis Child*. 1998; 78:518–523.
187. Wen-jin Fu, Shi-long Xiong , Yao-gao Fang . Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *Endocrine*. 2011; zaakceptowane do druku w dniu 6 lipca 2011.
188. Yi-Hua Yang, Xiao-Jie, Shen-Ren Chen i in. Changes of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in type 2 diabetic patients with nephropathy: one year observational follow-up study. *Endocr*. 2009;36:45-51.
189. Yan QW, Yang Q, Mody N i in. The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 2533–2540.
190. Gavrilov V, Harman-Boehm I, Amichay D i in. Kidney function and retinol status in type 2 diabetes mellitus patients. *Acta Diabetol*. 2011;
191. Schaefer L, Gilge U, Heidland A i in. Urinary excretion of cathepsin B and cystatins as parameters of tubular damage. *Kidney Int Suppl*. 1994;47:S64-7.
192. Mogensen CE: Early glomerular hyperfiltration in insulin dependent diabetics and late nephropathy. *Scand J Clin Invest*. 1986; 46:201–206.
193. Drummond KM, Kramer MS, Suissa S i in. Effects of duration and age at onset of type 1 diabetes on preclinical manifestations of nephropathy. *Diabetes*. 2003; 52:1818–1824.
194. Stone ML, Craig ME, Chan AK i in. Natural history and risk factors for microalbuminuria in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:2072–2077.
195. Danne T, Mortensen H, Hougaard P i in. Persistent differences among centers over 3 years in glycemic control and hypoglycemia in a study of 3,805 children and adolescents with type 1 diabetes from the Hvidovre study group. *Diabetes Care*. 2001; 24:1342–1347.