

„АДЖИБАДЕМ СИТИ КЛИНИК УМБАЛ ТОКУДА“ ЕАД

КЛИНИКА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

Д-Р СТАНИСЛАВА ЛЮБОМИРОВА ИЛИЕВА

**РОЛЯ НА НЯКОИ ПАТОГЕНЕТИЧНИ И
ГЕНЕТИЧНИ ФАКТОРИ ЗА РАЗВИТИЕТО
НА ДИАБЕТНАТА НЕФРОПАТИЯ ПРИ
ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2**

АВТОРЕФЕРАТ

на

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА
СТЕПЕН „ДОКТОР“**

Докторска програма „Вътрешни болести“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

ДОЦ. Д-Р ЛЪЧЕЗАР БОЯНОВ ЛОЗАНОВ, Д.М.

СОФИЯ, 2024

Дисертационният труд съдържа 103 страници и е онагледен с 33 таблици и 15 фигури. Библиографията включва 148 източника, от които 15 на кирилица и 133 на латиница.

Дисертационният труд е насочен за публична защита след разглеждане от разширен научен колегиум към Клиниката по Вътрешни болести.

Публичната защита ще се състои на 19.02.2025 от 14,00 ч. в Аулата на АСК УМБАЛ „Токуда“.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
ВЪВЕДЕНИЕ	5
МЕТОДИКА НА ПРОУЧВАНЕТО	7
1. Цел и задачи	7
2. Методи на проучването	8
РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО	15
1. Хистологични находки	15
2. Анализ на демографски и клинични показатели	18
3. Лабораторни биомаркери, с оглед връзката им с изявата на ДН	23
ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	32
ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ ЗА КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА	44
1. Изводи	44
2. Препоръки за клиничната практика	45
ПРИНОСИ	46
ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА ...	47
БЛАГОДАРНОСТИ	48

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АТ II – Ангиотензин II

АТЗ – Автоимунно тиреоидно заболяване

АХ – Артериална хипертония

ГБМ – Гломерулна базална мембрана

ДББ – Диабетна бъбречна болест

ДН – Диабетна нефропатия

ДПНП – Диабетна полиневропатия

ДР – Диабетна ретинопатия

ЕТ-1 – Ендотелин 1

ЗД – Захарен диабет

ИБС – Ишемична болеста на сърцето

МСБ – Мозъчно-съдова болест

ОСГСХ – Огнищно-сегментна гломерулна склероза и хиалиноза

ПАБ – Периферна артериална болест

ПББ – Пункционна бъбречна биопсия

РААС – Ренин-ангиотензин-алдостерон система

ХБЗ – Хронично бъбречно заболяване

e-GFR – Изчислена гломерулна филтрация

AGE-s – Крайни продукти на гликирането

HDL – Липопотеини с висока плътност

LDL – Липопотеини с ниска плътност

MTHFR – Метилентетрахидрофолат редуктаза

PKC – Протеин киназа C

ROS – реактивни кислородни субстанции

ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет (ЗД) е широко разпространено, социално-значимо заболяване, водещо до ранна инвалидизация и повишена смъртност, поради сърдечно-съдови, неврологични и бъбречни усложнения. През последните десетилетия диабетната нефропатия (ДН) е водеща причина за терминален стадий на бъбречна болест и започване на бъбречно-заместителна терапия в световен мащаб. Установено е, че тя е независим рисков фактор за увеличаване на сърдечно-съдовата смъртност при диабетите.

Преобладаващата част от пациентите със захарен диабет са с тип 2 (около 90% от всички диабетци), поради което голяма част от диабетите с хронично бъбречно заболяване (ХБЗ) са с тип 2.

Докато Захарният диабет тип 1 е автоимунно заболяване, дължащо се на деструкция на бета-клетките на панкреаса при лица до 40 годишна възраст, то тип 2 е многофакторно заболяване, за чиято изява имат значение генетични, метаболитни и други фактори, произтичащи от начина на живот и хранене. За изява на усложненията на ЗД от значение са както гликемичния контрол и давността на диабета, така и множество метаболитни, етнически, генетични, проинфламаторни и други фактори (битови, социално-икономически), които са обект на непрекъснати изследвания.

За разлика от ЗД тип 1, при който началото на заболяването е ясно детерминирано във времето и изявата на късните усложнения (микро и макроангиопатии) може да се очаква след петата година, при ЗД тип 2 често пъти началото е неясно и самото заболяване нерядко се диагностицира в стадий на вече проявени усложнения с необратим характер.

Значителна част от пациентите със ЗД тип 2 в световен мащаб имат хронично бъбречно заболяване (ХБЗ), като честотата му нараства с напредване на възрастта. Проблемът произтича не само от големия

брой диабетици с ХБЗ, но също така и от диагностицирането на бъбречното увреждане в напреднал стадий, с минимални възможности за терапевтично повлияване.

Ранната диагностика на ХБЗ при пациентите със ЗД тип 2 е от значение за постигане на добър терапевтичен отговор и предотвратяване и забавяне на прогресията към терминален стадий на бъбречно заболяване. Тя включва както клинични и лабораторни изследвания, така и осъществяване на хистологична верификация чрез перкутанна пункционна бъбречна биопсия (ПББ). Това се налага от факта, че не всички пациенти със ЗД тип 2 и ХБЗ са с диабетна нефропатия. Голяма част от тях са с недиабетно бъбречно увреждане. Извършването на хистологична верификация (пункционна бъбречна биопсия) при пациентите с ХБЗ и ЗД тип 2 е от основно значение за разграничаване на възможните заболявания, причиняващи нарушаване на бъбречната структура и функция. Това допринася за определяне на правилния терапевтичен подход и прогноза.

В последните десетилетия са натрупани огромен обем знания, относно патогенезата, морфологичната находка и клиничната изява на диабетната нефропатия. Въпреки това, диагностицирането ѝ нерядко се извършва в напреднал стадий, когато възможностите за терапевтично повлияване са силно ограничени. Поради тази причина на преден план излиза необходимостта от увеличаване на познанията, относно механизмите за развитие и прогресия на бъбречните увреждания при ЗД тип 2, в светлината на все по-големите терапевтични възможности през последните години. Това провокира клиницистите към ранна диагностика на въглехидратните нарушения, а изследователите – към търсене на биомаркери, които биха могли да се използват като ранни предиктори на диабетните бъбречни увреждания, още в предклиничен стадий. Това би допринесло за разработване на стратегии за ранна диагностика, превенция и лечение на диабетните бъбречни увреждания.

МЕТОДИКА НА ПРОУЧВАНЕТО

1. Цел и задачи

Целта на проучването е да се установи връзка между конкретни клинични и лабораторни биомаркери и изявата на диабетната нефропатия при пациенти със захарен диабет тип 2, с оглед установяване на предиктори за нейното развитие и оптимизиране на диагностиката на диабетните бъбречни увреждания.

За изпълнение на тази цел се поставиха следните задачи:

1. Да се определи хистологичната диагноза след провеждане на пункционна бъбречна биопсия на пациенти с ХБЗ и ЗД тип 2 и да се направи анализ на честотата на хистологичните находки при наблюдаваните групи.
2. Да се направи анализ на определени клинични и лабораторни показатели при биопсираните диабетици и получените резултати да се съпоставят с контролна група пациенти с хистологично доказани нефропатии, без ЗД.
3. Да се определи евентуалната връзка между наличието на диабетна нефропатия и останалите микро- и макроангиопатични усложнения на ЗД.
4. Да се установи наличието на връзка между определени биомаркери (клинични, лабораторни, генетични) при диабетниците с и без ДН, както и между всички диабетици и недиабетиците.
5. Да се установят конкретни предиктори на диабетните бъбречни усложнения при пациентите със ЗД тип 2.
6. Да се предложат диагностичен подход и препоръки за клиничната практика в насока оптимизиране на диагностиката на диабетните бъбречни усложнения.

2. Методи на проучването

Извършено е проучване, включващо 91 пациенти, хоспитализирани в Отделението по Нефрология, Клиника по Вътрешни болести на „АСК УМБАЛ – Токуда“ за периода м.01.2018 – м.02.2024г. Всички пациенти са с ХБЗ и хистологично доказани нефропатии. 55 от пациентите са със захарен диабет тип 2, установен преди или по време на диагностициране на бъбречното заболяване, а останалите 36, са без ЗД. Пациентите са на възраст между 22 и 76 години, като 55 (60.4%) от тях са мъже, а 36 (39.6%) - са жени.

При почти всички пациенти перкутанните пункционни бъбречни биопсии са осъществени в Отделението по Нефрология на „АСК УМБАЛ - Токуда“ в посочения по-горе период или преди това.

В проучването не са включени пациенти със ЗД тип 1, с кортикостероид-индуциран ЗД, както и такива, при които ЗД се изяснява след установяване на бъбречното заболяване.

Пациентите са разделени на 3 групи, в зависимост от наличието на ЗД и диабетна нефропатия:

- I група (n=30): Пациенти със ЗД тип 2 и хистологично доказана диабетна нефропатия
- II група (n=25): Пациенти със ЗД тип 2, при които в бъбречната хистология са налице други, недиабетни бъбречни увреждания
- III група – контролна (n=36): Пациенти с хистологично доказани нефропатии, без ЗД.

Индикациите за провеждане на пункционна бъбречна биопсия при всички пациентите са: наличие на повишена албуминурия или протеинурия, измерени в 24-часова диуреза и/или нарушена бъбречна функция.

При пациентите от трите групи са изследвани следните клинични и лабораторни параметри:

➤ Обща оценка на клиничния статус по органи и системи

- Наличие на артериална хипертония
- Наличие на усложнения на ЗД:
 - Диабетна ретинопатия
 - Диабетна полиневропатия
 - Диабетна макроангиопатия
 - Диабетна гангрена
- Наличие на обезитет, установен чрез измерване на Body Mass Index (BMI)
- Лабораторни показатели на бъбречната функция:
 - Цистатин С
 - Серумен креатинин
 - Изчислена гломерулна филтрация (e-GFR)
- Лабораторни показатели на метаболитния контрол:
 - Гликиран хемоглобин
 - Липиден профил, включващ:
 - Липопротеини с ниска плътност (LDL)
 - Липопротеини с висока плътност (HDL)
 - Триглицериди
 - Пикочна киселина
- Екскреция на общ белтък и албумин в 24-часова диуреза
- Лабораторни маркери на възпаление и съдова увреда в кръвта:
 - С-реактивен протеин (CRP)
 - Интерлевкин 6 (IL-6)
 - D-dimer
 - Фибриноген
- Изследване на полиморфизма на метилентетрахидрофолат редуктазния ген (MTHFR) ген, в частност вариантите A1289C и C677T.
- Изследване на нивата на хомоцистеин и фолиева киселина в серума
- Изследване на показатели на тиреоидната функция:
 - Тиреостимулиращ хормон (TSH)
 - Свободен тироксин (FT4)
 - Микрозомални антитела (MAT)
 - Тиреоглобулинови антитела (TAT)

От всички пациенти, включени в проучването са събрани подробни анамнестични данни, относно предшестваща артериална хипертония и съпътстваща антихипертензивна терапия. За артериална хипертония се приема персистиране на повишено артериално налягане $\geq 140/90$ mmHg или нормални стойности на артериалното налягане на фона на антихипертензивна терапия. Артериалната хипертония при изследваните пациенти е първична (Есенциална хипертония) или вторична, обусловена от бъбречното заболяване или други фактори.

Наличието на обезитет при всички пациенти е оценено чрез изследване на Body Mass Index (BMI), изчислен с помощта на ръста и теглото на пациента по формулата:

$$\text{BMI} = \text{Телесно тегло (kg)} / \text{Ръст (m)}^2$$

От клинично значение за проучването е наличието на затлъстяване, независимо от степента му, поради което трите степени на обезитета са обединени при статистическата обработка.

Всички диабетици, включени в проучването са оценени по отношение наличието на късни усложнения на ЗД: диабетна ретинопатия, диабетна полиневропатия, диабетна макроангиопатия, диабетна гангрена.

Диабетна ретинопатия е установена след консултация с офталмолог и осъществена фундоскопия, при която са намерени някои от характерните за ЗД съдови промени в очното дъно (микроаневризми, ексудати, неоваскуларизация, хеморагии, оток на макулата), оформящи непролиферативна или пролиферативна форма на диабетна ретинопатия.

Диабетната полиневропатия е верифицирана след консултация с невролог, като при някои пациенти е налице предхождащо електромиографско изследване (ЕМГ). Пациентите са оценени и по отношение наличието на автономна диабетна невропатия – гастропареза, неврогенни нарушения на пикочния мехур.

Диабетна макроангиопатия е установена, поради наличие на съпътстваща ИБС, периферна артериална болест на крайниците (ПАБ), мозъчно-съдова болест.

Диабетна гангрена е доказана при наличие на съдово-исхемични рани на ходилото, свързани със ЗД или предхождащи ампутации на крайници, вследствие на диабетна гангрена.

Оценката на бъбречната функция при пациентите от трите групи е осъществена чрез изследване на серумен Цистатин С (Cystatin C), серумен креатинин и изчислената на базата на серумния креатинин гломерулна филтрация (estimated glomerular filtration rate: e-GFR). За изчисляване на e-GFR е използвана стандартизираната формула на CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) equation. Формулата е базирана на стойностите на креатинина в серума, възрастта на пациента, пола и расата (черна или не), като през 2021 г. формулата е актуализирана и е премахнат показателя раса.

Стадият на ХБЗ при изследваните пациенти е определен въз основа на общоприетата класификация, предложена от KDIGO (Kidney Disease Outcomes and Quality Initiative) през 2002г., съгласно която са обособени 5 стадия на хроничните бъбречни заболявания, в зависимост от степента на намаляване на гломерулната филтрация (eGFR):

- 1 стадий – eGFR над $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ - запазена бъбречна функция
- 2 стадий – eGFR $89 - 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ - леко намалена бъбречна функция
- 3a стадий – eGFR $59 - 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$ - леко до умерено намалена бъбречна функция
- 3b стадий – eGFR $44 - 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$ - умерено до силно намалена бъбречна функция
- 4 стадий – eGFR $29 - 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ - силно намалена бъбречна функция
- 5 стадий – eGFR под $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ - бъбречна недостатъчност

Цистатин С е използван като алтернативен биомаркер за оценка на бъбречната функция. Изследван е в серума на пациентите. Референтните стойности варират между 0.5 и 0.95 mg/l.

Изследвани са нивата на гликиран хемоглобин в кръвта, пикочната киселина в серума, както и следните показатели на липидния профил: липопротеини с ниска плътност (LDL), липопротеини с висока плътност (HDL) и триглицериди. Като клинично значима е приета стойност на гликиран хемоглобин над 6,5%, стойности на LDL и триглицериди над референтните и стойности на HDL под референтните за клиничната лаборатория.

При всичките 91 пациента в проучването е осъществено изследване на количество белтък в 24-часова диуреза. Изследването на 24-часовата албуминурия е извършено само при 61 от пациентите, тъй като останалите са били с високостепенна протеинурия, която предполага и наличие на високостепенна албуминурия. За патологични се приемат стойности на албуминурията над 30 mg/24 часа и над 150 mg/24 ч. за общата протеинурия.

При всички пациенти са изследвани серумните нива на възпалителните маркери CRP и IL-6, както и нивата на коагулационните показатели D-dimer и фибриноген в плазмата, които индицират коагулационни нарушения и съдова увреда. Като клинично значими се приемат повишените стойности на CRP, IL-6 и D-dimer, над референтните за клиничната лаборатория. Относно фибриноген, за патологични се приемат както стойности под референтните норми, така и над нормите за клиничната лаборатория.

При всички пациенти е изследвано носителството на следните варианти на MTHFR ген: A1289C и C677T. Като клинично значимо се приема носителството на патологичните алели, съотв. 1289C и 677T в хетерозиготна или хомозиготна форма.

Обусловените от генетичните дефекти отклонения в нивата на хомоцистеин и фолиева киселина индицират изследването им при пациентите в проучването. Хомоцистеинът е изследван при всичките

91 пациента, докато фолиевата киселина – при 80 от пациентите. Като патологични се приемат повишените нива на хомоцистеин над горната референтна граница за лабораторията и понижените под лабораторните норми, стойности на фолатите.

Наличието на тиреоидна патология при всички пациенти от трите групи е установено чрез изследване на следните показатели: TSH (тиреостимулиращ хормон), FT4 (свободен тироксин), МАТ (микророз-мални антитела), ТАТ (тиреоглобулинови антитела). Като клинично значими се приемат стойности на TSH и FT4, съотв. под и над лабораторните норми, които насочват към наличие на повишена или намалена функция на щитовидната жлеза. Стойности на ТАТ и МАТ над нормата се отчитат като патологични, с оглед съпътстващ автоимунен тиреоидит на Хашимото.

При пациентите от трите групи е извършена перкутанна пункционна бъбречна биопсия (ПББ) за етиологично уточняване на ХБЗ. Всички пациенти са с поставена хистологична диагноза, като ПББ е извършена преди или по време на провеждане на проучването.

Показания за осъществяване на ПББ при пациентите от трите групи са следните:

- Наличие на нарушена бъбречна функция
- Наличие на различна по степен протеинурия или албуминурия
- Наличие на еритроцитурия със суспектен гломерулен произход
- Имунологични и клинични данни за системно заболяване на съединителната тъкан

ПББ не е проведена и съответните пациенти не са включени в проучването при наличие на някои от следните противопоказания: ехографски установена асиметрия на бъбреците или наличие на единствен функциониращ бъбрек, активна уроинфекция, коагулационни нарушения, бъбречна поликистоза, нарушено общо състояние, тежка сърдечно-съдова и дихателна недостатъчност, туморни процеси, изтънен бъбречен кортекс под 1 см.

Диагнозата „диабетна нефропатия“ при диабетиците е поставена на базата на заключение от патолог за наличието ѝ. Основание за това е намирането на типичните за ДН промени в гломерулите: задебеляване на гломерулната базална мембрана, разрастване на мезангиални клетки и матрикс, нодуларна гломерулосклероза (лезии тип Kimmelstiel-Wilson), дифузна гломерулосклероза. Стадиите на ДН не са взети под внимание в настоящето проучване.

Статистическата обработка е извършена с помощта на софтуер SPSS, версия 22. Резултатите са представени като абсолютни (n) и относителни честоти (%) за категорийни променливи, средна аритметична (x) и стандартно отклонение (SD) за нормално разпределените количествени и медиана (Me) с интерквартилен размах (IQR; 25 и 75 персентиля) за тези, чието разпределение не е Гаусово. Формата на разпределението е проверена с тестовете на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк.

Сравненията на средни между две групи са направени с t-тест или тест на Ман-Уитни в зависимост от формата на разпределението. Сравненията между разпределението на категорийни променливи при две групи са направени с хи-квадрат анализ (Екзактен тест на Фишер, когато е приложим). Резултатите при стойности на $p < 0.05$ са приети за значими, с грешка от първи род 5% и гарантиране на резултатите с 95%. Само за хи-квадрат анализа, поради малкия брой пациенти в групите, стойностите на p между 0.05 и 0.10 са приети за гранични.

РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО

1. Хистологични находки

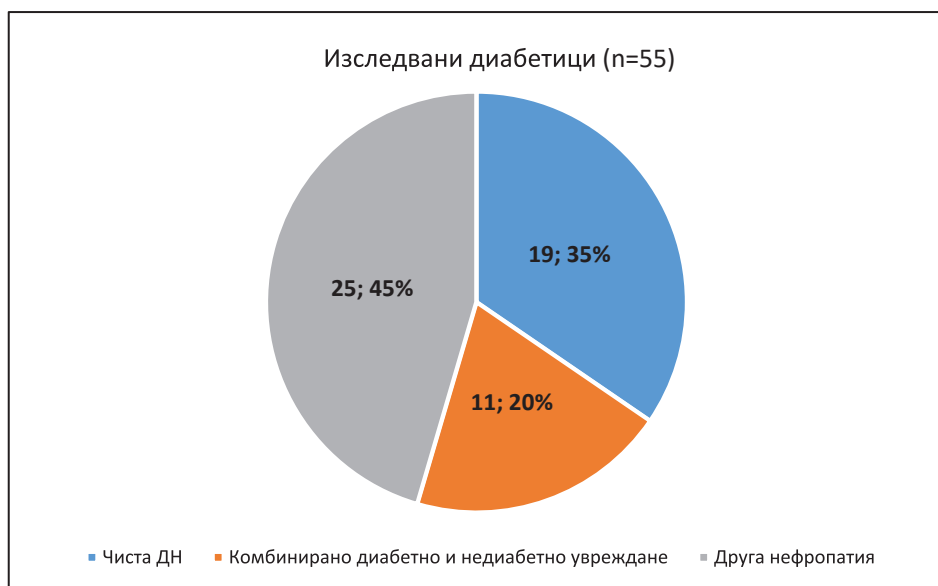
Хистологичните диагнози въз основа на проведените пункционни бъбречни биопсии при пациентите от трите групи са следните:

- I гр. (Диабетици с ДН): при всичките 30 пациента са налице хистологични данни за ДН. При 11 (36.6%) от тях, освен ДН е налице и друго съпътстващо недиабетно бъбречно увреждане:
 - при 5 (16.7%) – тубулоинтерстициални промени
 - при 3 (10.0%) от тях се установяват съдово-хипертонични промени;
 - при 1 (3.3%) – ОСГСХ;
 - при 1 (3.3%) – мембранозна нефропатия;
 - при 1 (3.3%) – Хроничен гломерулонефрит с отлагане на С3
- II гр. (Диабетици без ДН):
 - 11 (44.0%) – Съчетание от хипертензивна и тубулоинтерстициална нефропатия
 - 4 (16.0%) – Хипертензивна нефропатия
 - 3 (12.0%) – Мембранозна нефропатия
 - 2 (8.0%) – ИгА нефропатия
 - 2 (8.0%) – ОСГС
 - 1 (4.0%) – Тубулоинтерстициална нефропатия
 - 1 (4.0%) – Мезангиокапилярен (Мембранопротиферативен гломерулонефрит)
 - 1 (4.0%) – Хроничен гломерулонефрит с отлагане на С3
- III гр. (Недиабетици):
 - 9 (25.0%) – ОСГС
 - 7 (19.4%) – Тубулоинтерстициална нефропатия
 - 6 (16.6%) – ИгА Нефропатия
 - 4 (11.1%) – Лупусна нефропатия
 - 3 (8.3%) – Мембранозна нефропатия
 - 3 (8.3%) – Идиопатичен нефрозен синдром

- 3 (8.3%) - Мезангиокапилярен (Мембранопрролиферативен гломерулонефрит)
- 2 (5.6%) – Хроничен гломерулонефрит с отлагане на С3
- 1 (2.8%) – Хипертензивна нефропатия

От 55 изследвани диабетици, 19 (34.5%) са единствено с промени, съответстващи на ДН, 11 (20%) са с комбинирано диабетно и недиабетно увреждане и 25 (45%) са с друг вид нефропатия (фигура 1).

Фигура 1. Честота на диабетните и недиабетните бъбречни увреждания при изследваните диабетици



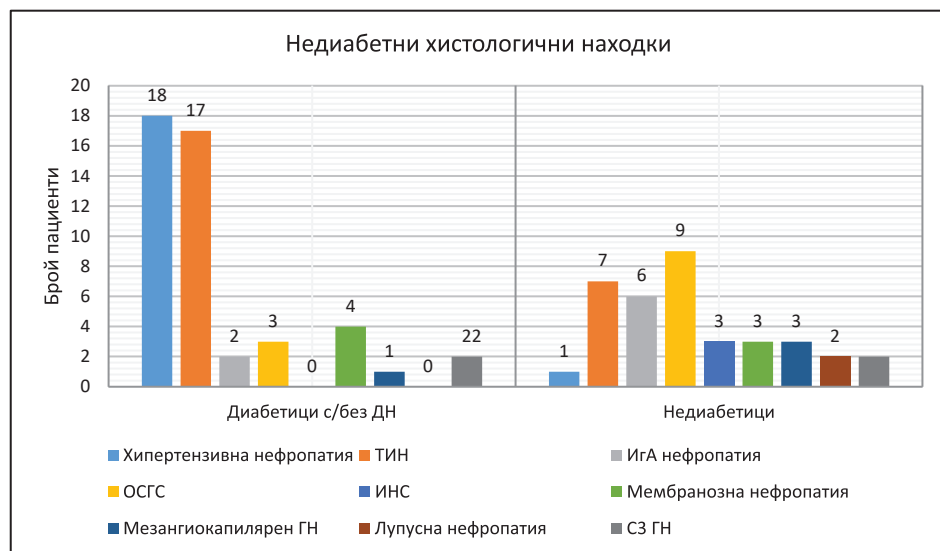
Най-честите недиабетни хистологични диагнози при диабетите с диабетна нефропатия са съответно хроничния тубулоинтерстициален нефрит и хипертензивната нефропатия (26.7%). Сред диабетите без ДН (гр. II), най-разпространената хистологична диагноза е хипертензивната нефропатия (в 60% от случаите), следвана от хроничния тубулоинтерстициален нефрит (48% от пациентите), което е сигнификантно повече спрямо пациентите с ДН (гр. I), както и спрямо тези без ЗД (гр. III). Няма сигнификантна разлика по отношение честотата на имунните нефропатии между двете групи диабетици - таблица 1.

Таблица 1. Представяне на хистологичните диагнози при пациентите и сравнение между групите

		I гр. Диабетици с ДН		II гр. Диабетици без ДН		III гр. Недиабетици		Р гр. 1 и 3	Р гр. 2 и 3	Р гр. 1 и 2
		n	%	n	%	n	%			
Диабетна нефропатия	Да	30	100.0%	0	0.0%	0	0.0%			<0.001
	Не	0	0.0%	25	100.0%	35	100.0%			
Хипертензивна нефропатия	Да	3	10.0%	15	60.0%	1	2.8%	0.323	<0.001	<0.001
	Не	27	90.0%	10	40.0%	35	97.2%			
Тубуло- интерстициална нефропатия	Да	5	16.7%	12	48.0%	7	19.4%	0.771	0.018	0.012
	Не	25	83.3%	13	52.0%	29	80.6%			
ИгА нефропатия	Да	0	0.0%	2	8.0%	6	16.7%	0.028	0.453	0.202
	Не	30	100.0%	23	92.0%	30	83.3%			
ОСГС	Да	1	3.3%	2	8.0%	9	25.0%	0.017	0.106	0.585
	Не	29	96.7%	23	92.0%	27	75.0%			
ИНС	Да	0	0.0%	0	0.0%	3	8.3%	0.245	0.262	
	Не	30	100.0%	25	100.0%	33	91.7%			
Мембранозна нефропатия	Да	1	3.3%	3	12.0%	3	8.3%	0.620	0.682	0.320
	Не	29	96.7%	22	88.0%	33	91.7%			
Мезангио- капилярен (Мембрано- пролиферативен гломерулонефрит)	Да	0	0.0%	1	4.0%	3	8.3%	0.245	0.638	0.455
	Не	30	100.0%	24	96.0%	33	91.7%			
Полунен гломерулонефрит	Да	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%			
	Не	30	100.0%	25	100.0%	36	100.0%			
Лупусна нефропатия	Да	0	0.0%	0	0.0%	4	11.1%	0.120	0.137	
	Не	30	100.0%	25	100.0%	32	88.9%			
С3- гломерулонефрит	Да	1	3.3%	1	4.0%	2	5.6%	0.999	0.999	0.999
	Не	29	96.7%	24	96.0%	34	94.4%			

Преобладаващите недиабетни бъбречни увреждания сред диабетиците, независимо от наличието на ДН, са хипертензивна и тубулоинтерстициална нефропатии, които се срещат в значително по-малка степен в групата на недиабетиците. Иmunните нефропатии са със сравнително малка честота в диабетните групи – фигура 2.

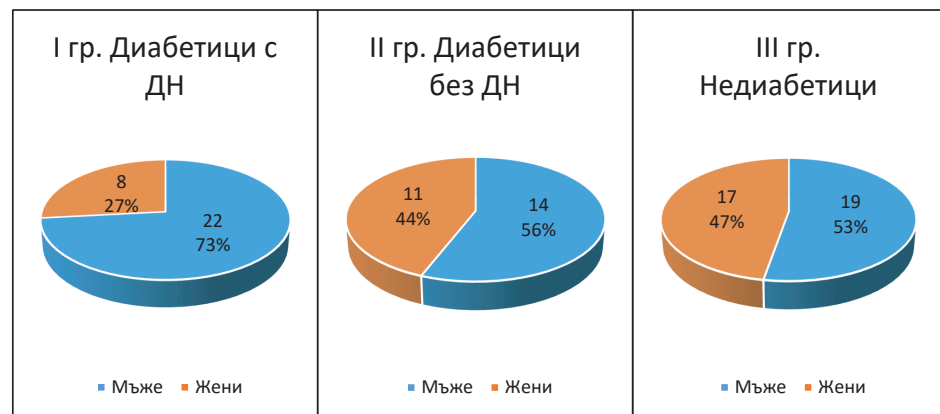
Фигура 2. Сравнение на пациентите със и без ЗД по отношение на хистологичните диагнози



2. Анализ на демографски и клинични показатели

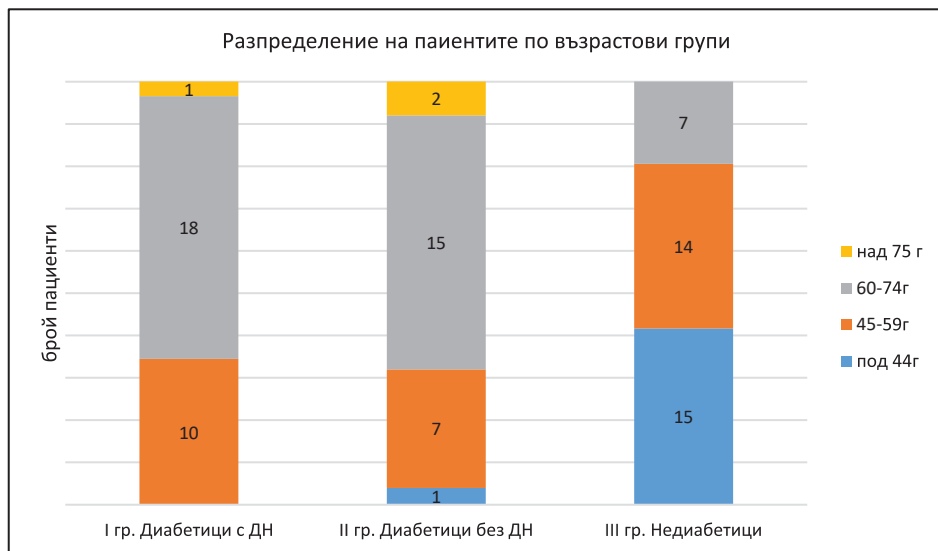
Преобладаващата част от диабетите с ДН са мъже (73%). При диабетите без ДН има лек превес на мъжете, докато в групата на пациентите без ЗД разпределението е приблизително по равно – фигура 3.

Фигура 3. Съотношение между двата пола при пациентите от трите групи



Пациентите, включени в проучването са на възраст между 22 и 76 години. На фигура 4 е представено възрастово разпределението на пациентите от трите групи, като е използвана периодизацията на възрастовите групи, според СЗО.

Фигура 4. Разпределение на пациентите по възрастови групи, според периодизацията на СЗО



Средната възраст на диабетиците от I и II гр. е приблизително еднаква, съотв. 62 ± 8 и 62 ± 9 години. Не се установява сигнификантна възрастова разлика между диабетиците с и без ДН, като преобладаващата част от пациентите са във възрастовия диапазон 60-74 години. От друга страна, пациентите от контролната, недиабетна, група са със значимо по-ниска възраст (46 ± 14 години), в сравнение с диабетиците – таблица 2.

Таблица 2. Средна възраст на пациентите от трите групи

	I гр. Диабетици с ДН	II гр. Диабетици без ДН	III гр. Недиабетици	Р за гр. 1 и 3	Р за гр. 2 и 3	Р за гр. (1+2) и 3	Р за гр. 1 и 2
Възраст (години)	62 ± 8	62 ± 9	46 ± 14	<0.001	<0.001	<0.001	0.742

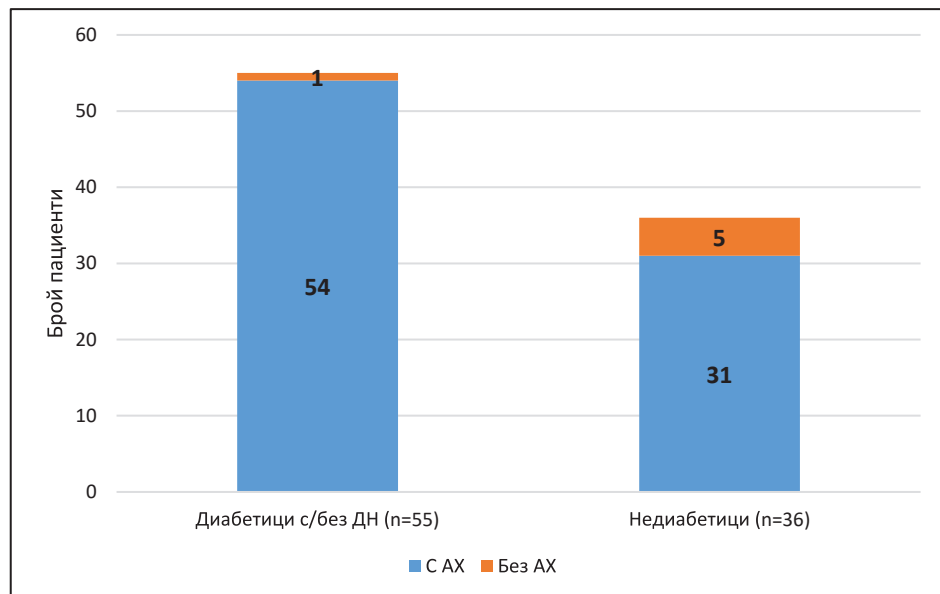
Средната давност на ЗД на пациентите общо за двете групи е 13 ± 7 години, като няма статистически значима разлика между пациентите с ДН и тези без ДН. (Табл.3):

Таблица 3. Давност на ЗД при двете групи диабетици

		I гр. Диабетици с ДН	II гр. Диабетици без ДН	P за гр. I и II
Давност на ЗД	Средно аритметично в години	13	12	0.617
	Стандартно отклонение (SD)	8	5	

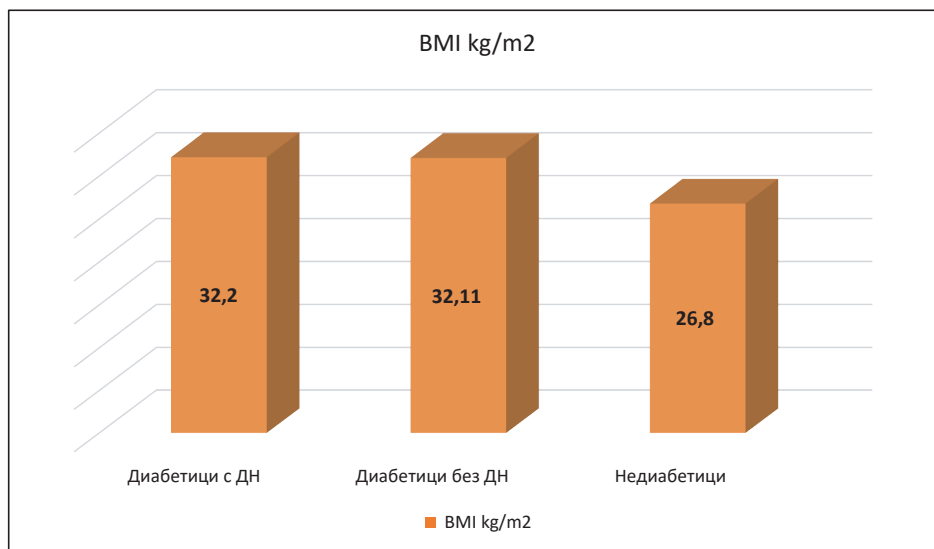
Всички пациенти със ЗД и ДН имат и артериална хипертония. Същата се открива в 96% при диабетиците без ДН. Артериалната хипертония е в значителна степен по-изявена при диабетиците, независимо от наличието на ДН, в сравнение с недиабетиците ($p=0.034$) – фигура 5.

Фигура 5. Разпределение на диабетиците и недиабетиците според наличието на АХ



Обезитетът се установява в еднаква степен сред диабетиците, независимо от наличието на ДН. Средните стойности на ВМІ са, съответно 32.2 kg/m² за гр. I и 32.1 kg/m² за гр. II. За разлика от тях, при контролната, недиабетна група, средната стойност на ВМІ е 26.8 kg/m² – фиг. 6. Това оформя сигнификантна разлика ($p < 0.001$) между диабетиците с/без ДН и контролната група недиабетици.

Фигура 6. Средни стойности на ВМІ в kg/m² при пациентите от трите групи



Пациентите от двете диабетни групи – I и II са изследвани по отношение наличието на диабетна ретинопатия, диабетна полиневропатия, диабетна макроангиопатия и диабетна гангрена. Установява се, че 50% от диабетиците с ДН имат и диабетната ретинопатия. Последната не е открита при нито един от диабетиците без ДН, което обуславя сигнификантна разлика между двете групи ($p < 0.001$). При нито един от пациентите не е открита автономна диабетна невропатия. Разликата в честотата на останалите диабетни усложнения не се счита за статистически значима – таблица 4.

Таблица 4. Усложнения на захарния диабет сред диабетичите от двете групи

		I гр. Диабетици с ДН		II гр. Диабетици без ДН		Р за групи I и II
		n	%	n	%	
Диабетна ретинопатия	Да	15	50%	0	0%	<0.001
	Не	15	50%	25	100.0%	
Диабетна полиневропатия	Да	20	66.7%	11	44.0%	0.091
	Не	10	33.3%	14	56.0%	
Диабетна макроангиопатия	Да	10	33.3%	7	28.0%	0.670
	Не	20	66.7%	18	72.0%	
Диабетна гангрена	Да	2	6.7%	0	0.0%	0.495
	Не	28	93.3%	25	100.0%	

Бъбречната функция при пациентите от трите групи е представена чрез изследване на серумния креатинин, цистатин С и изчислената гломерулна филтрация (e-GFR) по стандартизираната формула CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) equation. Преобладаващият брой пациенти от трите групи са в 4 стадий на ХБЗ. 3б стадий не е установен при нито едно от изследваните лица. Показателите на бъбречната функция не показват статистически значима разлика между отделните групи – таблица 5.

Таблица 5. Показатели на бъбречната функция и разпределение на пациентите според стadiите на ХБЗ (KDIGO).

		I гр. Диабетици с ДН		II гр. Диабетици без ДН		III гр. Недиабетици		Р за гр. I и III	Р за гр. II и III	Р за гр. I и II
		n	%	n	%	n	%			
Серумен креатинин	Норма	10	33.3%	11	44.0%	16	44.4%	0.358	0.973	0.418
	Над нормата	20	66.7%	14	56.0%	20	55.6%			
Cystatin C	Норма	5	17.2%	7	29.2%	9	25.0%	0.449	0.721	0.302
	Над нормата	24	82.8%	17	70.8%	27	75.0%			
ХБЗ - стадии	I стадий	6	20.0%	3	14.3%	12	34.3%	0.330	0.087	0.056
	II стадий	3	10.0%	8	38.1%	4	11.4%			
	IIIa стадий	4	13.3%	1	4.8%	5	14.3%			
	IIIb стадий	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%			
	IV стадий	12	40.0%	9	42.9%	13	37.1%			
	V стадий	5	16.7%	0	0.0%	1	2.9%			

3. Лабораторни биомаркери, с оглед връзката им с изявата на ДН

Пациентите от трите групи са съпоставени по отношение на следните показатели на метаболитния контрол: гликиран хемоглобин (HbA1C%), LDL, HDL, триглицериди, пикочна киселина в серум. Резултатите показват липса на статистически значима разлика в стойностите на гликирания хемоглобин, LDL, HDL, триглицеридите и пикочната киселина между диабетичите с и без ДН. Поднормени нива на HDL се установяват в сигнификантно по-голяма степен при диабетичите от двете групи, в сравнение с недиабетичите ($p=0.001$). Статистически значимо повишени триглицериди се наблюдават при всички диабетичи, в сравнение с недиабетичите ($p=0.043$), като липсват значими разлики между отделните групи пациенти. Трите групи пациенти не показват сигнификантни различия по отношение на хиперурикемията – таблица 6.

Таблица 6. Съпоставяне на пациентите от трите групи по отношение показателите на метаболитния контрол

Показатели / Групи		I гр. Диабетици с ДН		II гр. Диабетици без ДН		III гр. Недиабетици		Р за гр. 1 и 3	Р за гр. 2 и 3	Р за гр. (1+2) и 3	Р за гр. 1 и 2
		n	%	n	%	n	%				
Гликиран хемоглобин	Норма	14	46.7%	13	52.0%	33	100.0%	<0.001	<0.001	<0.001	0.694
	Над нормата	16	53.3%	12	48.0%	0	0.0%				
LDL	Под нормата	4	14.3%	7	28.0%	1	3.0%	0.201	0.022	0.050	0.449
	Норма	22	78.6%	16	64.0%	27	81.8%				
	Над нормата	2	7.1%	2	8.0%	5	15.2%				
HDL	Под нормата	19	67.9%	17	68.0%	9	27.3%	0.006	0.007	0.001	0.991
	Норма	9	32.1%	8	32.0%	23	69.7%				
	Над нормата	0	0.0%	0	0.0%	1	3.0%				
Триглицериди	Норма	15	50.0%	13	52.0%	26	72.2%	0.064	0.106	0.043	0.883
	Над нормата	15	50.0%	12	48.0%	10	27.8%				
Пикочна киселина	Норма	24	80.0%	17	68.0%	31	86.1%	0.507	0.089	0.184	0.309
	Над нормата	6	20.0%	8	32.0%	5	13.9%				

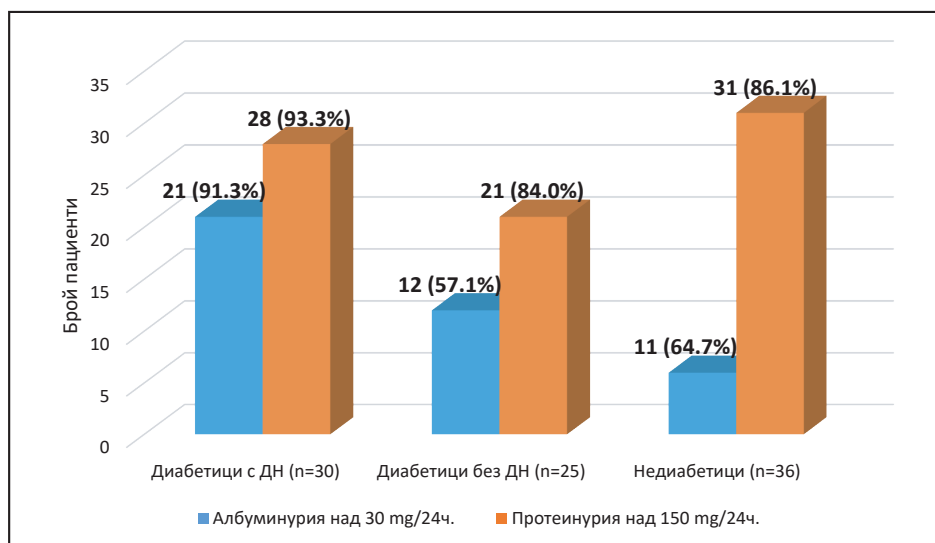
Изследване на 24-часова протеинурия е извършено при всички пациенти от трите групи. Изследване на албумин в 24 часова диуреза е осъществено, съответно при 23 пациенти от I гр., 21 пациенти от II гр. и при 17 пациенти от III гр., тъй като останалите са били с високостепенна протеинурия. Установява се, че албуминурията е налична при 91.3% от пациентите с диабетна нефропатия и само при 57,1% от диабетниците без ДН ($p=0.009$). За разлика от албуминурията, повишение на общата протеинурия се наблюдава при значителна част от пациентите от двете диабетни групи, съответно при 93.3% от гр.I и при 84.0% от гр.II – $p=0.394$ (таблица 7). Съпоставянето с пациентите без ЗД не отчита сигнификантна разлика както по отношение на албуминурията, така и по отношение на общата протеинурия.

Таблица 7. Екскреция на общ белтък и албумин в 24-часова диуреза при пациентите от трите групи със сравнение между групите

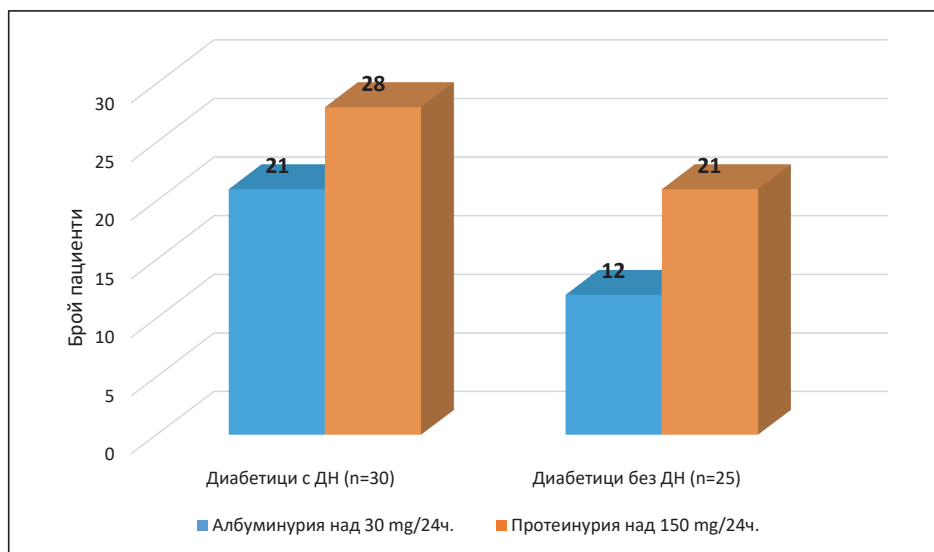
		I гр. Диабетици с ДН		II гр. Диабетици без ДН		III гр. Недиабетици		Р за гр. 1 и 3	Р за гр. 2 и 3	Р за гр. 1 и 2
		n	%	n	%	n	%			
Албуминурия	Норма	2	8.7%	9	42.9%	6	35.3%	0.053	0.635	0.009
	Повишена	21	91.3%	12	57.1%	11	64.7%			
Протеинурия	Норма	2	6.7%	4	16.0%	5	13.9%	0.442	0.999	0.394
	Повишена	28	93.3%	21	84.0%	31	86.1%			

Албуминурията се среща в по-голяма степен при диабетиците с ДН и в значително по-малка при тези без ДН. За пациентите от контролната група най-характерно е повишението на общата протеинурия, в сравнение с албуминурията (фигури 7 и 8).

Фигура 7. Екскрецията на албумин и общ белтък в 24-часова диуреза при трите групи

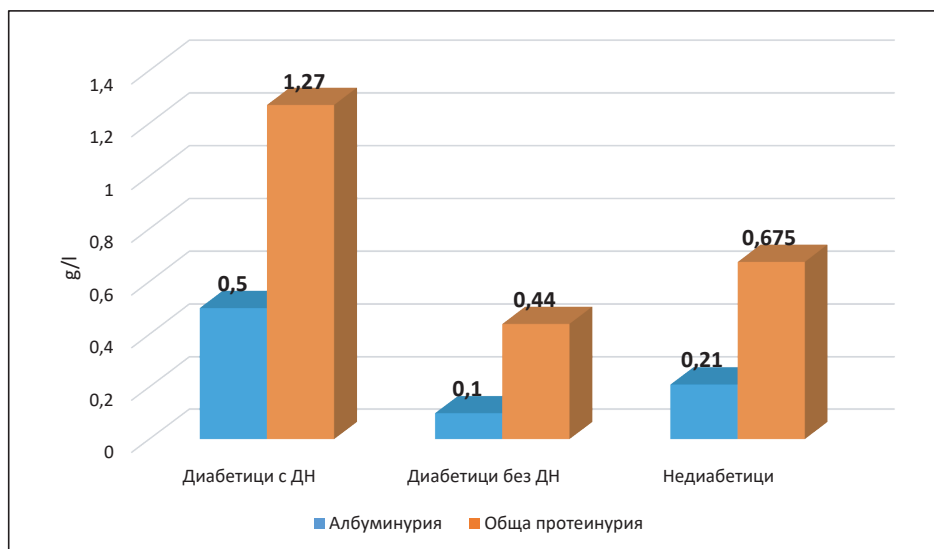


Фигура 8. Албуминурия и протеинурия в 24-часова диуреза при диабетците с и без ДН



Сравнението с помощта на теста на Ман-Уитни установи, че диабетците с ДН показват най-високи средни стойности на албуминурията и общата протеинурия, в сравнение с диабетците без ДН и пациентите без ЗД (фигура 9).

Фигура 9. Средни стойности на албуминурията и общата протеинурия при трите групи



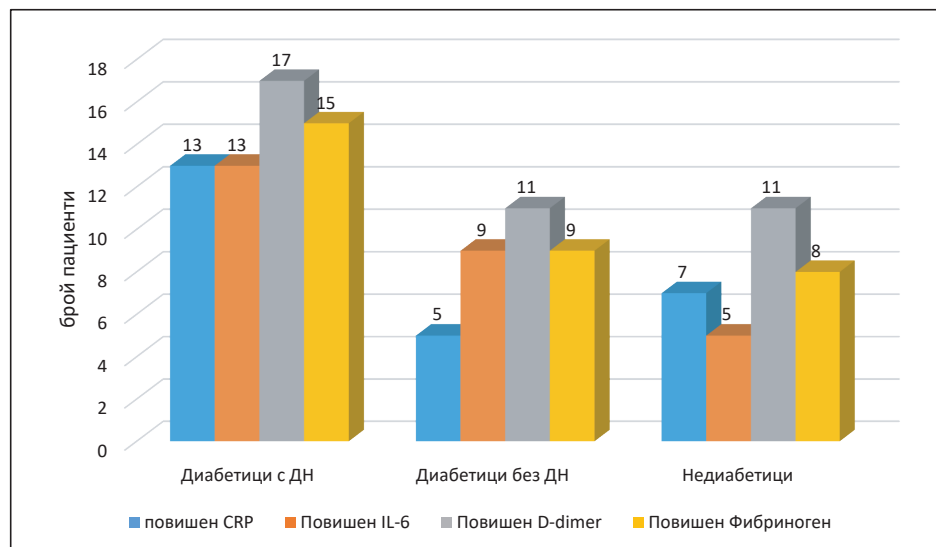
При пациентите от трите групи са изследвани CRP и IL-6 като инфламаторни показатели и фибриноген и D-dimer като маркери за съдова увреда. Установява се значително повишение и на 4-те изследвани показателя при диабетичите с ДН спрямо недиабетиците. IL-6 показва сигнификантна разлика и при диабетичите без ДН, в сравнение с недиабетиците ($p=0.043$). Липсват значими отклонения в четирите показателя при диабетичите с ДН, в сравнение с диабетичите без ДН – таблица 8.

Таблица 8. Сравнение на пациентите от трите групи по отношение на възпалителните и коагулационни маркери

		I гр. Диабетици с ДН		II гр. Диабетици без ДН		III гр. Недиабетици		Р за гр. 1 и 3	Р за гр. 2 и 3	Р за гр. 1 и 2
		n	%	n	%	n	%			
CRP	Норма	17	56.7%	20	80.0%	29	80.6%	0.035	0.999	0.066
	Повишен	13	43.3%	5	20.0%	7	19.4%			
IL-6	Норма	17	56.7%	16	64.0%	31	86.15	0.007	0.043	0.580
	Повишен	13	43.3%	9	36.0%	5	13.9%			
D-dimer	Норма	13	43.3%	14	56.0%	25	69.4%	0.033	0.282	0.439
	Повишен	17	56.7%	11	44.0%	11	30.6%			
Фибриноген	Под нормата	1	3.3%	0	0.0%	0	0.0%	0.026	0.238	0.333
	Норма	14	46.7%	16	64.0%	28	77.8%			
	Повишен	15	50.0%	9	36.0%	8	22.2%			

При значителна част от пациентите с ДН се установява наднормено покачване по отношение на четирите изследвани маркера, което не се наблюдава при пациентите без ЗД – фигура 10.

Фигура 10. Разпределение на пациентите от трите групи според наличието на повишени нива на CRP, IL-6, D-dimer и Фибриноген



Съпоставянето на средните стойности на възпалителните и коагулационни маркери между всички пациенти със ЗД и тези без ЗД показва сигнификантно повишение на CRP, IL-6, D-dimer и фибриноген при всички пациенти със ЗД, независимо от наличието на ДН, в сравнение с недиабетиците – таблица 9.

Таблица 9. Сравнение на средните стойности на възпалителните и коагулационни маркери при всички диабетици и недиабетиците

	Диабетици с/без ДН			Недиабетици			P
	Median	Percentile 25	Percentile 75	Median	Percentile 25	Percentile 75	
CRP	2.95	1.38	10.7	1.67	0.54	3.2	0.006
IL-6	5.6	2.9	11.66	2.7	1.45	4.69	<0.001
D-dimer	0.56	0.32	1.03	0.32	0.22	0.58	0.003
Фибриноген	3.7	3.2	5.0	3.3	2.61	3.98	0.004

При пациентите в проучването е проведено изследване по отношение носителството на патологичен алел на MTHFR-ген (вариантите A1289C и C677T) и свързаните с генетичните дефекти отклонения в нивата на хомоцистеин и фолиева киселина в серума на пациентите. Резултатите не установяват сигнификантна разлика в носителството на патологичен алел на MTHFR ген при нито една от изследваните групи, както и не се наблюдава значимо различие между диабетиците с ДН и тези без ДН. Повишените нива на хомоцистеин при диабетиците с ДН, спрямо тези без ДН са в рамките на статистически граничен резултат ($p=0.097$). Липсва статистически значима разлика между диабетици с и без ДН по отношение на нивата на фолиевата киселина, като такава не се наблюдава при съпоставяне между всяка една от трите групи – таблица 10.

Таблица 10. Разпределение на пациентите от трите групи според носителството на патологични алели на MTHFR-ген (A1289C и C677T), отклоненията в серумните нива на хомоцистеин и фолиева киселина

		I гр. Диабетици с ДН		II гр. Диабетици без ДН		III гр. Недиабетици		Р за гр. 1,2 и 3	Р за гр. 1 и 3	Р за гр. 2 и 3	Р за гр. 1 и 2
		п	%	п	%	п	%				
MTHFR A1289C	Хомозигот по нормален алел	16	53.3%	14	56.0%	16	44.4%	0.910	0.771	0.658	0.947
	Хетерозигот	12	40.0%	9	36.0%	17	47.2%				
	Хомозигот по мутацията	2	6.7%	2	8.0%	3	8.3%				
MTHFR C677T	Хомозигот по нормален алел	13	43.3%	11	44.0%	10	27.8%	0.420	0.232	0.266	0.997
	Хетерозигот	12	40.0%	10	40.0%	22	61.1%				
	Хомозигот по мутацията	5	16.7%	4	16.0%	4	11.1%				
Хомоцистеин	Норма	9	30.0%	13	52.0%	13	36.1%	0.231	0.600	0.217	0.097
	Повишен	21	70.0%	12	48.0%	23	63.9%				
Фолиева киселина	Под норма	3	12.5%	0	0.0%	7	19.4%	0.149	0.290	0.104	0.158
	Норма	18	75.0%	19	95.0%	28	77.8%				
	Повишена	3	12.5%	1	5.0%	1	2.8%				

Наблюдава се разпространено носителство на мутантни алели на MTHFR-ген: 1289C и 677T сред изследваните лица, без сигинификантна връзка с наличието на ЗД или ДН.

При всички пациенти от трите групи са изследвани TSH, TAT и МАТ. FT4 е изследван при 29 пациента от гр. I (диабетици с ДН) и при всички пациенти от останалите две групи. Не се установява статистически значима разлика в изследваните показатели между диабетите с и

без ДН, както и между всяка една от трите групи поотделно. Анализът на резултатите при трите изследвани групи показва, че при гр.І (Диабетици с ДН) честотата на тиреоидната патология е минимална. При гр.ІІ (Диабетици без ДН) – 16% са със субклиничен хипотиреоидизъм и повишени ТАТ и МАТ, обуславящи наличие на автоимунно тиреоидно заболяване (Тиреоидит на Хашимото). В гр.ІІІ (Недиабетици) – 16.6% са с някакъв вид субклинично тиреоидно нарушение (хипо- или хиперфункция) или TSH извън норма по друга причина, като в 22% са с повишен МАТ, като маркер за автоимунно тиреоидно заболяване (АТЗ) – таблица 11.

Таблица 11. *Разпределение на пациентите и сравнение между трите групи по отношение показателите на тиреоидната функция и тиреоидните антитела*

		І гр. Диабетици с ДН		ІІ гр. Диабетици без ДН		ІІІ гр. Недиабетици		Р за гр. 1,2,3	Р за гр. 1 и 3	Р за гр. 2 и 3	Р за гр. 1 и 2
		n	%	n	%	n	%				
TSH	Под нормата	1	3.3%	0	0.0%	3	8.3%	0.116	0.174	0.242	0.053
	Норма	29	96.7%	21	84.0%	30	83.3%				
	Повишен	0	0.0%	4	16.0%	3	8.3%				
FT4	Под нормата	2	6.9%	0	0.0%	1	2.8%	0.473	0.332	0.671	0.235
	Норма	27	93.1%	24	96.0%	33	91.7%				
	Повишен	0	0.0%	1	4.0%	2	5.6%				
МАТ	Норма	29	96.7%	21	84.0%	28	77.8%	0.088	0.033	0.745	0.165
	Повишен	1	3.3%	4	16.0%	8	22.2%				
ТАТ	Норма	26	86.7%	21	84.0%	30	83.3%	0.928	0.745	0.999	0.780
	Повишен	4	13.3%	4	16.0%	6	16.7%				

Не се установява връзка между наличието на ДН и нарушения в тиреоидната функция и съпътстващо автоимунно тиреоидно заболяване. Не се установява повишена честота на АТЗ при пациентите със ЗД тип 2.

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Диагностицирането на ХБЗ при диабетите е предизвикателство за клиницистите. Все още диагнозата ДН се основава на клинични критерии, а ПББ се извършва само при суспекция за недиабетно бъбречно увреждане. В голяма част от случаите са налице рискове и противопоказания за извършване на манипулацията, произтичащи от инвазивния ѝ характер. До момента са проведени голям брой проучвания в световен мащаб за установяване на ролята на определени клинични, лабораторни и генетични биомаркери за изявата на диабетните бъбречни увреждания. Освен наличието на албинурия, към момента липсват надеждни неинвазивни критерии за ДН.

Настоящото проучване анализира определени клинични, лабораторни и генетични маркери при 55 пациента със ЗД тип 2 и ХБЗ и контролна група от 36 пациента с ХБЗ без ЗД. Осъществяването на ПББ при всички пациенти позволява да се постави точна хистологична диагноза, която определя ясно типа на бъбречните увреждания. При диабетите това доказва наличието на ДН, както и на недиабетни бъбречни увреждания.

Хистологични находки

Проучването потвърждава високата честота на недиабетните бъбречни увреждания при диабетите, с доминиране на тубулоинтерстициалните и съдово-хипертонични промени. Този тип увреждания са характерни за по-напредналите стадии на ДН и до голяма степен определят прогресията към терминална бъбречна недостатъчност. Роля за тяхната изява имат всички фактори, способстващи за изявата на ДН, като метаболитни нарушения, хронична хипоксия, експресия на растежни фактори и оксидативен стрес, водещи до проинфламаторен и профибротичен процес. Високата честота на тубулоинтерстициалните и съдово-хипертонични промени дава основание те да бъдат разглеждани като изява на ДББ, независимо от липсата на албинурия.

Значение на пола за изявата на диабетната нефропатия

Анализът на демографските показатели показва категорично преобладаване на мъжкия пол сред диабетиците с диабетна нефропатия: $n=22$ (73.3%), като само 8 (26.6%) от пациентите с ДН са жени. Това дава основание да се обсъжда мъжкия пол като рисков за изява на ДН. В литературата са налице редица проучвания с противоречиви резултати по отношение влиянието на пола върху изявата на ДН. Това показва, че значението на пола като фактор за изява на ДН не трябва да се разглежда самостоятелно, а в контекста на евентуални расови, генетични, хормонални или метаболитни фактори.

Влияние на възрастта за изявата на диабетната нефропатия

Преобладаващият брой диабетици в проучването, независимо от наличието на диабетна нефропатия са във възрастовия диапазон 60-74 години, като средната възраст на диабетиците от двете групи е 62 години. Имайки предвид, че ЗД се изявява след 40 годишна възраст, то установяването на ХБЗ при пациенти с предшестваш ЗД става по-късно, в сравнение с недиабетиците. От друга страна, при голяма част от диабетиците ХБЗ се открива сравнително късно, в стадий на нарушена бъбречна функция. Настоящото проучване не отчита възрастта като рисков фактор за изява на ДН, но потвърждава покачващата се честота на бъбречните увреждания при диабетиците с напредване на възрастта.

Давност на захарния диабет като фактор за развитието на диабетната нефропатия

Връзката между давността на ЗД и развитието на ДН е доказана при множество проучвания в литературата. Настоящото проучване установи сходство в средната давност на ЗД при пациентите от двете диабетни групи, а именно 13 ± 7 години. Известно е, че ЗД тип 2 има дълъг латентен период на метаболитните отклонения, поради което наличие на ДН може да се установи още при откриването му. При по-голямата част от пациентите, ХБЗ е диагностицирано в напреднал

стадий (при $eGFR < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$), което не позволява установяване на връзка с началната изява на ЗД. Данните от проучването показват, че давността на ЗД над 10 години би могла да насочи към наличие на бъбречни увреждания, но в случая не е определящ фактор за развитие на ДН.

Роля на съпътстващите захарния диабет усложнения

В настоящия труд са анализирани съпътстващите микро- и макроангиопатични усложнения, както и наличието на диабетна полиневропатия (ДПНП) при пациентите с и без ДН. Резултатите показват, че половината от пациентите с ДН имат и диабетна ретинопатия (ДР), независимо дали е пролиферативна или непролиферативна, докато ДР не е открита при нито един от диабетите без ДН - $p < 0.001$. Това подкрепя известната вече ролята на ДР като рисков фактор и предиктор за изява на ДН. Установяването на ДР, независимо от стадия, налага активно търсене на диабетни бъбречни увреждания при пациентите.

По отношение на ДПНП, проучването установи, че над половината от изследваните диабетици, $n=31$ (56.4%) от общо 55 са с ДПНП. Тя се среща по-често сред диабетите с ДН (66.7%), отколкото при тези без ДН (44.0%). Това обуславя несигнификантна разлика между двете групи пациенти ($p=0.091$), която статистическият анализ приема за гранична, поради малкия брой пациенти в групите. Общият патогенетичен механизъм на микроваскуларните усложнения при диабетите предполага често съчетаване на посочените усложнения. Резултатите от нашето проучване не могат да приемат наличието на ДПНП като надежден предиктор за изява на ДН, но показват значителното превалиране на ДПНП сред диабетите с ХБЗ.

Автономната диабетна невропатия не е установена при нито един от пациентите в проучването, поради което връзката ѝ с изявата на ДН не може да бъде коментирана.

Наличието на макросъдови увреждания (ИБС, ПАБ, МСБ) се установява при по-малко от половината диабетици в проучването, съотв. в 33.3% при пациентите с ДН и в 28.0% при диабетиците без ДН. Тяхното развитие се обяснява с атеросклеротичен процес, който е акцелериран при диабетиците, поради съпътстващата дислипидемия и оксидативен стрес. Нашите резултати не доказват връзка между макроваскуларните усложнения и развитието на ДН. Въпреки това, механизмите за макросъдовите увреждания са налице при диабетиците и най-вероятно способстват за съдово-хипертоничните увреждания, които се установяват при голяма част от биопсираниите диабетици, в т.ч. и в настоящото проучване. Те определено имат значение за прогресия на ХБЗ към терминален стадий. Установяването на макроангиопатия при пациентите със ЗД тип 2 налага активно търсене на бъбречно-съдови увреждания, в т.ч. и на стеноза на реналните артерии.

Диабетната гангрена е късно съдово усложнение на ЗД, което често води до ампутация на долните крайници и инвалидизация на пациентите. Обикновено се наблюдава при дългогодишен лош гликемичен контрол, в съчетание с други микро- и макроангиопатични усложнения. В настоящото проучване диабетната гангрена е открита само при 2 от пациентите с ДН и при нито един от диабетиците без ДН. Освен ДН, и при двамата са налице ДР, ДПНП, макроангиопатия, както и ХБЗ 4 ст с $eGFR\ 25\ ml/min/1.73m^2$. Установяването на диабетна гангрена до голяма степен насочва към наличието на множествени диабетни усложнения, включително ДН.

Оценка на бъбречната функция

Преобладаващият брой пациенти и в трите групи са в 4 стадий на ХБЗ, като 16.7% от пациентите с ДН са в ХБЗ 5 ст с предстоящо започване на бъбречно-заместителна терапия. Бъбречната функция отразява степента на прогресия на бъбречните увреждания, независимо от причината. В нашето проучване тя насочва към относително късна диагностика на ХБЗ, особено при диабетиците.

Анализ на клинични показатели – артериална хипертония и оbezитет и връзката им с диабетната нефропатия

Артериалната хипертония (АХ) е установена при всички пациенти със ЗД, с изключение на един от пациентите без ДН. Въпреки широкото разпространение на АХ при пациентите без ЗД в проучването (86.0%), е налице сигнификантна разлика между всички диабетици, независимо от наличието на ДН и недиабетиците ($p=0.034$). В световен мащаб, ролята на АХ като рисков фактор за ДН е доказана, като нейната изява, наред с албуминурията и прогресивно намаляващата гломерулна филтрация, е един от клиничните критерии за ДББ. Данните от настоящото проучване показват, че АХ би могла да бъде рисков фактор за изява на ХБЗ при диабетиците, но не конкретно за ДН. Наличието и давността на АХ обуславят бъбречните съдови увреждания и допринасят за ускорената прогресия на ХБЗ.

Обезитетът ($BMI \geq 30.0$) е широко разпространен сред пациентите със ЗД в проучването, съответно в 76.7% от диабетиците с ДН и в 75.0% от тези без ДН. Наличието му е свързано с инсулиновата резистентност, която е ключов фактор в патогенезата на ЗД тип 2. Разликата с контролната недиабетна група е съществена ($p < 0.001$), като там само 28.7% от пациентите са със затлъстяване.

Настоящото проучване потвърждава ролята на обезитета като фактор за изява и прогресия на ХБЗ при диабетиците, но не и конкретно за ДН.

Значение на маркерите на метаболитния контрол за изявата на ДН

Лошият гликемичен контрол се счита за един от определящите фактори за развитието на диабетните усложнения, в т.ч. и на ДН. Златният стандарт за установяване на контрола на ЗД е гликирания хемоглобин ($HbA1C$). В настоящото проучване той е изследван при всички диабетици, като не се установява статистически значима разлика в стойностите му между диабетиците с и без ДН. Приблизително

половината от пациентите в двете групи имат $HbA1C >6.5\%$, който се наблюдава при диабетиците с ДН в 53.3%, а при тези без ДН – в 48.0%. Тези резултати не позволяват да се приеме гликемичния контрол като маркер и предиктор на ДН, имайки предвид, че $HbA1C$ е динамичен показател и отразява контрола на ЗД за конкретен период от време.

Показателите на липидната обмяна, изследвани в проучването са серумните нива на LDL, HDL и триглицеридите. Според Американската Диабетна Асоциация (ADA) таргетните стойности на липидите при диабетиците са: $LDL < 2.5 \text{ mmol/L}$, $HDL > 1.55 \text{ mmol/L}$ и триглицериди $< 1.8 \text{ mmol/L}$. В проучването, като клинично значими се приемат съответно стойности на LDL над 4.1 mmol/L , на HDL под 1.04 mmol/L и на триглицеридите над 1.8 mmol/L , изхождайки от референтните стойности на клиничната лаборатория. Повишени нива на LDL имат сравнително малък брой пациенти от двете диабетни групи, съотв. 7.1% от диабетиците с ДН и 8.0% от тези без ДН, за разлика от недиабетиците – 15.2%. Значителен процент от диабетиците в проучването, обаче показват ниски нива на HDL (67.9% от пациентите с ДН и 68.0% от тези без ДН), в сравнение с недиабетиците – 27.3%. Подобни са резултатите и по отношение на триглицеридите. Те са повишени при половината от диабетиците (50.0% от пациентите с ДН и 48% от тези без ДН), в сравнение с недиабетиците (27.8%), което потвърждава този добре известен факт. Въпреки, че в литературата са налице студии, установяващи връзката на ниските нива на HDL и ДН, то данните от настоящото проучване показват, че липсва статистически значима разлика между диабетиците с и без ДН по отношение на изследваните показатели на липидната обмяна, поради което те не биха могли да се използват като надеждни маркери и предиктори на ДН. Обект на дискусия и на по-нататъшни проучвания остава тезата дали ниските нива на HDL и повишените триглицериди само отразяват нарушенията в липидната обмяна при диабетците или биха могли да се свържат с изява на ХБЗ при пациентите със ЗД тип 2.

Ролята на повишената пикочна киселина за изявата на ХБЗ и влошаването на бъбречната функция е добре известна. В проучването

не се установява разлика в серумните нива на пикочната киселина между пациентите от трите групи, поради което тя не би могла да се обсъжда като маркер и предиктор на ДН.

Екскрецията на общ белтък и албумин като маркери на ДН

Наличието на повишена екскреция на албумин и общ белтък в 24-часова диуреза е едно от показанията за провеждане на ПББ при пациентите в проучването. Албуминурията е най-характерният белег за ДН и един от клиничните критерии за наличието ѝ. Резултатите показват сигнификантно повишена албуминурия ($p=0.009$) при пациентите с ДН, в сравнение с диабетиците без ДН. Това потвърждава значението на албуминурията като маркер за ДН. Липсата на сигнификантна разлика по отношение на общата протеинурия при диабетиците показва, че наличието на повишена екскреция на общ белтък с урината, независимо каква е албуминурията, не може да бъде маркер за ДН и налага хистологична верификация на структурните увреждания в бъбреците. Двама от диабетиците с ДН в проучването са с нормални стойности на екскреция на албумин и общ белтък с урината. Това, подобно на други проучвания в литературата показва, че неалбуминуричните форми на диабетната нефропатия не са чести, но се срещат в клиничната практика и могат да бъдат доказани единствено чрез ПББ.

Данните от проучването показват, че при диабетиците с недиабетни нефропатии по-често се наблюдава повишена екскреция на общ белтък с урината, за сметка на албуминурията. При диабетиците без ДН процентът на нормоалбуминурични пациенти е сравнително висок – 42.9%. Това се обяснява с факта, че преобладаващата част от тях са с тубулоинтерстициални и/или съдово-хипертонични бъбречни увреждания, които се проявяват клинично преди всичко с нарушена бъбречна функция и по-рядко – с нискостепенна албуминурия или протеинурия.

Значение на възпалителните маркери CRP и IL-6 за диагностиката на ДН

Захарният диабет е състояние, характеризиращо се с повишен оксидативен стрес и възпаление. Ролята на някои проинфламаторни цитокини за развитието на ДН е изследвана и доказана в редица проучвания. При настоящото проучване са изследвани два от възпалителните маркери – CRP и IL-6.

CRP е острофазов белтък, който се синтезира в черния дроб при инфекциозно или неинфекциозно възпаление. Той е с ниска специфичност, но с висока диагностична стойност като инфламаторен маркер. В проучването CRP е изследван при всички пациенти, като е взет под внимание, при липса на прояви на активна инфекция. Резултатите показват значимото му повишение при диабетиците с ДН в сравнение с недиабетиците ($p=0.035$) и статистически гранично повишение ($p=0.066$) спрямо диабетиците без ДН.

IL-6 е проинфламаторен цитокин с плеiotропно действие. Той е с доказана патогенетична роля за развитието на инсулиновата резистентност. Значението му за изявата на ДН е демонстрирана в редица проучвания. Настоящото проучване показва сигнификантно повишени нива на IL-6 при диабетиците с и без ДН ($p < 0.01$), в сравнение с недиабетиците, като такава е налице и при проведено сравнение между всяка от диабетните групи поотделно, спрямо недиабетиците. Липсва обаче, сигнификантна разлика между двете групи диабетици.

Независимо, че проучванията в литературата показват връзка между повишените възпалителни маркери (CRP и IL-6) и изявата на албуминурия и диабетни бъбречни увреждания, то резултатите от настоящото изследване не позволяват да приемем тези показатели като фактори, насочващи към наличието на ДН. Остава открит въпроса дали те не отразяват само проинфламаторното състояние и инсулиновата резистентност при ЗД тип 2. Въпреки това, повишението им при диабетиците с ХБЗ, в сравнение с пациентите без ЗД в настоящото проучване, показва вероятната им патогенетична роля в бъбречните

структурни увреждания при пациентите със ЗД тип 2, без да има конкретна връзка с ДН. Установяването на повишени нива на CRP и IL-6 при диабетиците налага активно търсене на съпътстващи бъбречни усложнения.

Показатели на кръвосъсирването и съдова увреда (D-dimer и фибриноген), като фактори за изявата на ДН

Пациентите със ЗД тип 2 показват склонност към повишена съсирваемост на кръвта и развитие на тромботични процеси. Това се обуславя от наличие на микросъдови увреждания, ендотелна дисфункция и тромбоцитна активация. В настоящото проучване е изследвана ролята на плазмените D-dimer и фибриноген, като маркери за изява и диагностика на ДН при пациенти със ЗД тип 2. Установяват се сигнификантно повишени стойности на D-dimer при пациентите с ДН, в сравнение с недиабетиците ($p=0.033$). Статистическият анализ не показва значима разлика по отношение на повишените нива на D-dimer при диабетиците с ДН и диабетиците без ДН, което не дава възможност да бъде използван като надежден маркер за ДН, но може да бъде дискутиран като фактор, благоприятстващ структурните увреждания на бъбреците и изява на ХБЗ при пациенти със ЗД тип 2.

Повишение на нивата на фибриногена при ДН са установени от някои автори, но значението му като маркер за ДН е все още дискутабилно. Настоящото проучване установи сигнификантно повишени нива на фибриноген при диабетиците с ДН, в сравнение с недиабетиците ($p=0.026$), но липса на значима разлика между диабетиците без ДН и недиабетиците, както и между двете групи диабетици. При съпоставяне на средните стойности на фибриноген между всички диабетици и недиабетици, се установи значимото му повишение при диабетиците, независимо от наличието на ДН, в сравнение с недиабетиците ($p=0.004$). Понижените стойности на фибриногена в плазмата не са от клинично значение, поради което не са интерпретирани в проучването. Тези резултати не позволяват да се приеме фибриноген като маркер за

ДН, но повишените му стойности биха могли да отразят наличието на микросъдови увреждания, като предпоставка за ХБЗ.

Носителство на мутантни алели на MTHFR ген, с оглед развитието на ДН

Полиморфизмът на MTHFR ген обуславя променена ензимна активност с ефект върху клетъчните функции при редица заболявания. От всичките 24 генетични варианта, най-много проучвания са налице при вариантите C677T и A1289C. MTHFR е ензим, участващ в реметилирането на хомоцистеина в метионин. Наличието на патологичния алел 677T в молекулата на MTHFR ген води до кодиране на ензим с понижена активност. В резултат на това се нарушава регулацията по отношение метаболизма на хомоцистеина и фолиевата киселина, с последващо повишение на хомоцистеина и понижено ниво на фолатите в серума. Свързаната с хиперхомоцистеинемията ендотелна дисфункция би могла да се разглежда като фактор, допринасящ за микросъдовите увреждания при диабетиците и изявата на ДН. Ето защо носителство на патологични алели на MTHFR C677T и MTHFR A1289C е изследвано при всички пациенти от трите групи.

Резултатите показват, че е налице широко разпространено носителство на мутантните алели 677T и 1289C в хетерозиготна и в по-малка степен в хомозиготна форма сред изследваната популация. Не се установява сигнификантна разлика между диабетиците с и без ДН, както и между диабетиците и недиабетиците по отношение носителството на посочените мутации. Въпреки множеството проучвания на български и чуждестранни колективи, които доказват връзка между носителство на патологичния алел 677T и изявата на ДН при пациентите със ЗД тип 2, то при настоящото проучване такава не се открива. Не се установява връзка и по отношение носителството на 1289C алела.

Хиперхомоцистеинемията показва лек превес при диабетиците с ДН, в сравнение с диабетиците без ДН, който се отчита като граничен ($p=0.097$) и не може да се приеме за статистически значим. Липсва сигнификантна

разлика между диабетите с и без ДН и пациентите без ЗД. Анализът на повишените на нива на хомоцистеин във всяка една от групите показва, че те се наблюдават преди всичко при пациенти с понижен eGFR. Така, от 30 диабетици с ДН в група I, 21 са с eGFR <60ml/min/1.73m², като 20 (95.2%) от тях са с повишен хомоцистеин. При диабетите без ДН, от 25 пациента, eGFR <60ml/min/1.73m² се наблюдава при 14, като 9 (64.3%) от тях са с хиперхомоцистеинемия. В групата на недиабетите, от 36 пациента общо, 20 са с eGFR <60ml/min/1.73m², като 18 от тях (90.0%) са с повишен хомоцистеин. Тези данни показват, че хомоцистеинът е сигнификантно повишен при пациентите с нарушена бъбречна функция от трите групи, което най-вероятно е свързано с намаление на реналния му клирънс, каквито данни са налице в някои проучвания. Въпреки множеството студии, които установяват връзка между хиперхомоцистеинемията и наличието на албуминурия, респ. ДН при пациенти със ЗД тип 2, то резултатите от настоящото проучване не позволяват да се приеме този показател като предиктор и маркер за диабетни бъбречни увреждания. Хомоцистеинът може да се разглежда като показател за влошаваща се бъбречна функция и прогресия на бъбречните увреждания, независимо от наличието на ЗД.

Фолиевата киселина е фактор в процеса на реметилиране на хомоцистеина в метионин и поддържане на нормалните му нива в серума. В този смисъл тя оказва благоприятен ефект върху ендотелната функция и превенцията на микросъдовите увреждания. Това дава основание да се потърси връзка между понижените нива на фолиевата киселина и изявата на ДН, като изследването ѝ е извършено и при трите групи в проучването. По време на провеждане на изследването пациентите не са приемали фолиево-заместителна терапия. Данните от проучването сочат, че намалени нива на фолиева киселина се наблюдават при малък брой от пациентите от трите групи, определящи несигнификантни разлики между двете диабетни групи, както и между диабетните и недиабетната група поотделно. Въпреки високият процент на хетеро- или хомозиготно носителство на патологичния 677T-алел на MTHFR –ген, ниски нива на фолиева киселина се откриват при незначителна част от пациентите в проучването.

Тези резултати не позволяват фолиевата киселина да се приеме като патогенетичен и предиктивен фактор за развитието на диабетните бъбречни увреждания. Въпреки това, следва да се вземат под внимание евентуалните ползи от фолиево-заместителната терапия върху ендотелната дисфункция при пациентите със ЗД.

Влияние на съпътстващата тиреоидна патология за изявата на ДН

Нарушенията в тиреоидната функция създават предпоставка за влошен контрол на артериалното налягане, развитие на дислипидемия и съдови увреждания, които от своя страна представляват рискови фактори за изявата на ДН. Това даде основание за изследване на показателите на тиреоидната функция и съпътстващо аутоимунно тиреоидно заболяване - АТЗ (TSH, FT4, TAT и МАТ) при пациентите от трите групи.

Анализът на резултатите не показва наличие на отчетлива връзка между придружаваща тиреоидна патология и диабетна нефропатия при пациентите. Не се установява повишена честота на АТЗ при пациентите със ЗД. Въпреки това, наличието на някакъв вид отклонение в тиреоидната функция или АТЗ е налице в 16% от диабетниците без ДН, което провокира активно търсене на тиреоидни заболявания при всички диабетици.

Анализът на изследваните клинични, лабораторни и генетични показатели в настоящото проучване показва, че не може да се установи значението на конкретен биомаркер, насочващ към наличието на ДН при пациентите със ЗД тип 2. Това е породено от многофакторната патогенеза на ДН, чиято изява е обусловена от едновременното действие на множество и различни патогенетични механизми. В този смисъл, терапевтичният подход към диабетно болните трябва да бъде комплексен и всеобхватен, с насока към възможно най-голям брой патологични нарушения.

ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ ЗА КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

1. Изводи

Анализът на резултатите от проучването позволява да се направят следните изводи:

1. Хистологичните резултати от проведените пункционни бъбречни биопсии при пациентите показват, че при 64% от диабетичите без диабетна нефропатия са налице тубулоинтерстициални и съдово-хипертонични промени, самостоятелно или в комбинация между тях. При 26,7% от диабетичите с диабетна нефропатия са налице същите изменения. Този факт подкрепя тезата за патогенетичната им връзка със Захарния диабет.
2. Мъжкият пол може да се разглежда като рисков фактор за диабетна нефропатия при диабетичите.
3. Изявата на диабетната нефропатия не е свързана с възрастта на пациентите и давността на захарния диабет. Въпреки това, възраст над 60 години и над 10-годишна давност на захарния диабет, се асоциират с по-висока честота на хронично бъбречно заболяване от всякакво естество при диабетичите.
4. Наличието на артериална хипертония, избыток, лошият гликемичен контрол, дислипидемията и хиперурикемията не са патогенетични фактори, водещи до изява на диабетна нефропатия, но са свързани с ускорената прогресия на налично хронично бъбречно заболяване при диабетичите.
5. Потвърждава се, че наличието на диабетна нефропатия се асоциира сигнификантно с диабетна ретинопатия, но не и с диабетна полиневропатия и макроангиопатия.

6. Изявата на диабетната нефропатия не е свързана с повишени възпалителни (CRP, IL-6) и коагулационни (D-dimer, фибриноген) маркери, но повишените им нива могат да се разглеждат като евентуални предиктори на хронично бъбречно заболяване при диабетиците.
7. Носителството на патологичните алели на MTHFR-ген: 1289C и 677T, както и повишените нива на хомоцистеин и понижените фолати в серума, нямат предикторна стойност по отношение на ДН.
8. Повишената обща протеинурия не винаги е свързана с диабетна нефропатия и налага провеждане на пункционна бъбречна биопсия.
9. При 16% от пациентите със захарен диабет тип 2 има отклонения в тиреоидната функция и/или съпътстващо аутоимунно тиреоидно заболяване.

2. Препоръки за клиничната практика

- Предлага се активно наблюдение за наличие на хронично бъбречно заболяване при пациенти със ЗД тип 2 и възраст над 60 години, с наличие на придружаваща диабетна ретинопатия, ниски нива на HDL в серума и повишени триглицериди.
- Трябва да се има предвид, че е налице голяма вероятност за хронично бъбречно заболяване при пациенти със захарен диабет тип 2 и повишени нива на D-dimer, IL-6 и фибриноген в кръвта, при липса на възпалителна, съдово-обусловена причина или коагулационни нарушения.
- Препоръчва се провеждане на пункционна бъбречна биопсия при всички диабетици с нарушена бъбречна функция и/или наличие на различна по степен протеинурия, тогава, когато липсват противопоказания.

ПРИНОСИ

1. За първи път в България, в рамките на едно проучване, е осъществено изследване и анализ на множество патогенетични и генетични фактори, водещи до изява на диабетната нефропатия.
2. За първи път в България е изследвана връзката между диабетната нефропатия и полиморфизма на метилентетрахидрофолат редуктазния ген (MTHFR-ген), вариант A1289C.
3. За първи път в България е изследвана връзката между диабетната нефропатия и тиреоидната дисфункция, като е установена висока честота на тиреоидните нарушения и автоимунните тиреоидни заболявания при диабетиците.
4. Извършваното хистологично верифициране на бъбречното засягане при пациентите позволява да се отдиференцират диабетните от недиабетните бъбречни увреждания при диабетиците, като се установи доминиране на тубуло-интерстициалните и съдовите увреждания при диабетиците, в сравнение с недиабетиците.
5. Потвърждава се ролята на пункционната бъбречна биопсия като единствен сигурен диагностичен критерий за диабетна нефропатия, както и за други, несвързани със захарния диабет бъбречни увреждания при диабетиците.
6. Установена е ролята на мъжкия пол като рисков фактор за диабетна нефропатия.
7. Установено е широко разпространено носителство на мутантни алели на MTHFR-ген (1289C и 677T), предимно в хетерозиготна форма сред изследваните лица, които за разлика от предишни проучвания, не показват връзка с изявата на диабетната нефропатия.

ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА

1. Илиева, С. Съвременен поглед върху бъбречните усложнения на захарния диабет – патогенеза, хистологични и клинични особености. MEDINFO, 2023, бр. 5, стр. 46-50. ISSN 1314-0345.
2. Ilieva, S., E. Naseva, L. Lozanov. Clinical and Laboratory Markers for Diabetic Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. BANTAO Journal 2023; 21(1): 10-16.
3. Ilieva, S., E. Naseva, L. Lozanov. Potential Predictors of Diabetic Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Oral presentation. 18th BANTAO Congress, Oct. 19-22, 2023, Thessaloniki, Greece.
4. Илиева, С. Затлъстяване и бъбречни заболявания – доклад. Интердисциплинарен симпозиум „Затлъстяване, захарен диабет и коморбидност: иновативни стратегии за диагностика и лечение“ – 12 ноември, 2022, АСК УМБАЛ „Токуда“.
5. Илиева, С. Диабетна бъбречна болест – съвременни насоки за диагностика и лечение през погледа на нефролога - доклад. Симпозиум, посветен на Световния Бъбречен Ден, 9 март 2023, „АСК УМБАЛ Токуда“.
6. Илиева, С. Крие ли предизвикателства диагностиката на диабетната нефропатия – доклад. XIV Интердисциплинарен симпозиум „Захарен диабет – предизвикателства в лечението на усложненията и придружаващите заболявания, 2.12.2023, „АСК УМБАЛ Токуда“.

Благодарности

Изказвам най-искрени благодарности към:

- ✓ Ръководството на АСК УМБАЛ „Токуда“ ЕАД за създадените условия за разработването и защита на докторантури
- ✓ Научния ми ръководител, Доц. д-р Лъчезар Лозанов, д.м., за ценните напътствия в процеса на подготовката на дисертацията
- ✓ Рецензентите Проф. д-р Боряна Делийска, д.м.н., Доц. д-р Милена Николова-Влахова, д.м. и останалите членове на научното жури – Проф. д-р Милена Станева, д.м., Проф. д-р Райна Робева, д.м. и Доц. д-р Александър Осиченко, д.м., чиито конструктивни препоръки спомогнаха дисертацията да придобие завършен вид
- ✓ Д-р Недялка Добрева-Гидийска, д.м. за доверието във възможностите ми и подкрепата
- ✓ Проф. д-р Татяна Иванова, д.м. и екипа на Дирекция научна и учебна дейност на АСК УМБАЛ „Токуда“ за методичните указания и помощ в процеса на подготовката на дисертацията
- ✓ Доц. Емилия Насева, д.м. за статистическата обработка
- ✓ Д-р Анушка Рапонджиева за професионалните дискусии и подкрепата
- ✓ Всички колеги от Отделенията по Нефрология и Ендокринология за съдействието при събирането на материала
- ✓ Медицинските сестри и целия персонал на Клиниката по Вътрешни болести на АСК УМБАЛ „Токуда“ за полаганите към пациентите грижи
- ✓ Д-р Веселина Колева и целия екип на Клинична лаборатория на АСК УМБАЛ „Токуда“ за акуратното извършване на лабораторните изследвания в този труд
- ✓ Проф. д-р Юлиан Ананиев, д.м. и екипа на патоморфологична лаборатория на ВМА-София за прецизната обработка и разчитане на резултатите от пункционните бъбречни биопсии
- ✓ Моето семейство за търпението и подкрепата