



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ**

д-р Севим Ахмед Шефкет

**ПРЕДИКТИВНА РОЛЯ НА NGAL – НЕУТРОФИЛ ГЕЛАТИНАЗА
АСОЦИИРАН ЛИПОКАЛИН КАТО РАНЕН МАРКЕР ЗА БЪБРЕЧНО
УВРЕЖДАНЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗД ТИП 1 и ЗД ТИП 2**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Специалност „Клинична лаборатория“

Научен ръководител – Доц. д-р Яна Бочева, д.м.

Варна, 2022 г.

Научно жури:

Проф. д-р Аделаида Лазарова Русева, д.м.

Доц. д-р Мариянка Генова Петрова-Яначкова, д.м.

Доц. д-р Таня Иванова Денева, д.м.

Проф. д-р Виолета Михова Йотова, д.м.

Доц. д-р Даниела Иванова Герова, д.м.

Резервни членове:

Проф. д-р Димитричка Дучева Близнакова, д.м.

Доц. д-р Дора Терзиева, д.м.

Дисертационният труд съдържа общо 150 страници, онагледени с 36 фигури и 47 таблици. Библиографията съдържа 221 литературни източника, от тях 10 на кирилица и 211 на латиница.

Проучването и лабораторният анализ са извършени в МДЛ „Клинична лаборатория“ – УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.

Докторантът работи в МДЛ „Клинична лаборатория“ към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, и заема длъжност „асистент“ в Катедра по клинична лаборатория към МУ „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна. Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен за защита пред научно жури от Катедрен съвет № 9, Катедра по клинична лаборатория към МУ „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна на 18.02.2022 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 13.05.2022 г.

СЪДЪРЖАНИЕ:

В
И. Л
И
Ф з
Д а Е
Р х О
И а К
И р Р
Б е П
Р н М
Е н П
Н д П
О а П
Б б П
З е П
О т П
Р и П
Д и Р
Р а Р
О б Я
д я Н
н о н
н ъ Н
о о Р
о о Р
д в н
в н в

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДБЗ – Диабетно бъбречно заболяване

ДН – Диабетна нефропатия

ЗД – Захарен диабет

ИПП – Инфекции на пикочните пътища

НДБЗ – Недиабетното бъбречно заболяване

ССЗ – Сърдечно-съдово заболяване

ТБН – Терминална бъбречна недостатъчност

ХБЗ – Хронично бъбречно заболяване

ACR – uAlbumin/uCreatinine ratio

– American Diabetes Association

– Albumin excretion rate

– Advanced glycation end products

– Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

– Coefficient of variation

– Enzyme-linked immunosorbent assay

GFR – Glomerular filtration rate

– Isotopic dilution mass spectrometry

– Interquartile Range

– Kidney Injury Molecule-1

– Lipocalin-2

– Lower limit of detection

– Lower limit of quantification

– Modification of Diet in Renal Disease

– Matrix metalloproteinase-9

–

NFκB – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

–

– Reactive oxygen species

– Standard deviation

–

– Upper limit of quantitation

– uNGAL/uCreatinine ratio

– World Health Organization

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет (ЗД) е социално значимо заболяване с нарастваща честота, която достига епидемични размери. Едно от основните и сериозни усложнения на ЗД е диабетното бъбречно заболяване (ДБЗ), което се асоциира с повишена сърдечно-съдова заболеваемост (ССЗ) и риск от развитие на терминална бъбречна недостатъчност (ТБН). Ранното откриване и по-доброто управление на ДБЗ може да забавят прогресията му до ТБН и да предотвратят сърдечно-съдовите усложнения. Към момента скоростта на гломерулна филтрация и скоростта на албуминова екскреция или съотношение албумин/креатинин са основни критерии за диагноза, класификация и стратификация на риска на ДБЗ. Тези показатели демонстрират редица ограничения, което налага търсенето и валидирането на нови маркери в диагностиката на ДБЗ.

Диабетната нефропатия е заболяване, засягащо преимуществено гломерула, но редица проучвания посочват предиктивната роля на тубулоинтерстициалните лезии в развитието и прогресията на ДБЗ. Неутрофил гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) е един от най-обещаващите тубуларни биомаркери в диагностиката на бъбречните заболявания. NGAL е показател за бъбречно структурно увреждане. Увеличените стойности на NGAL в плазма и урина индикират степента на субклинична тубуларна увреда и се явяват по-ранни маркери за настъпването на бъбречна дисфункция от класическите гломерулни показатели. Данните в литературата посочват NGAL като маркер с добър диагностичен профил в диагностиката на ДБЗ. Стойностите на NGAL при пациенти със ЗД корелират с прогресията на албуминовата екскреция, със спада на скоростта на гломерулна филтрация, с тежестта на бъбречното увреждане и с риска от прогресия до ТБН. NGAL е определян като ранен маркер на ДБЗ, който констатира развитието на бъбречна дисфункция преди повишената албуминова екскреция. Въпреки това редица причини извън ДБЗ могат да индуцират повишена експресия на NGAL като затлъстяване, инсулинова резистентност и ЗД, ССЗ и инфекции на пикочните пътища. Всичко това показва нуждата от допълнителни изследвания за да се изясни предиктивната стойност на NGAL в диагностиката на ДБЗ, породя нашия интерес и формира основанията за настоящото проучване.

За клиничната практика е подходящ имунотурбидиметричния тест за определяне на NGAL. За въвеждане на метода в рутинната практика е необходимо неговото верифициране и изграждане на методологично и възрастово зависими референтни граници за българската популация. За да се установи клинична приложимост на NGAL като маркер за бъбречно увреждане при ЗД, е необходимо да се оцени неговата диагностична надеждност и ефективността на методологично изведените cut-off стойности в разграничаването на пациентите с ДБЗ.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Захарен диабет и диабетно бъбречно заболяване

1.1. Епидемиологични данни

Захарният диабет (ЗД) е социално значимо заболяване с нарастваща честота както в световен мащаб, така и в България. През последните години глобалното разпространение на ЗД достига епидемични размери. Заболяването засяга 8% от световното население или повече от 450 милиона души, като този брой се очаква да нарасне до над 700 милиона души през 2045 г. [109]. Най-голямо увеличение на заболеваемостта от ЗД се очаква в Индия, Китай и САЩ [201]. Според друго глобално епидемиологично проучване, през 2013 г. 382 милиона души са имали диабет, като през 2035 г. се очаква този брой да се покачи до 592 милиона души население през 2015 г. е 10.3%, за сметка на 7.6% през 2013г [203]. Повишеното разпространение на ЗД води и до увеличение на пациентите, развили микро- и макро- васкуларни усложнения, асоциирани с диабета [185].

Една от основните и сериозни компликации на ЗД е бъбречното увреждане. Това диабетно усложнение се асоциира с повишен риск от развитие на терминална бъбречна недостатъчност (ТБН) и смъртност. Честотата на хроничното бъбречно заболяване (ХБЗ) сред пациентите със ЗД варира в различните страни от 20 до 40% [159]. Мета анализ, оценяващ разпространението на ХБЗ сред европейското население, докладва от 2 до 5 пъти по-висока честота на бъбречно увреждане сред пациенти със ЗД в сравнение с лица без диабет, 15.4% от пациентите със ЗД в Холандия и 41.5 % от тези в Германия имат бъбречно увреждане [35]. Проспективно проучване във Великобритания, проследяващо пациенти с новодиагностициран ЗД, съобщава, че при 38% от тях се установява повишена албуминова екскреция и при 29% от тях – понижен креатининов клирънс $< 60 \text{ mL/min}$, в рамките на 15 годишен период [160]. ЗД е водеща причина за развитие на ТБН. През 2014 г. между 5 – 66% от новите случаите на ТБН са причинени от диабет, с най-висока честота в Сингапур, Малайзия и Мексико, а най-ниска – в Норвегия, Румъния и Исландия. Рискът от развитие на ТБН при пациентите със ЗД е 10 пъти по-висок в сравнение с лица без диабет [115]. Световната здравна организация прогнозира, че от 2002 г. до 2030 г. смъртните случаи, свързани със ЗД, ще се удвоят [202]. Проучването FinnDiane, проследяващо пациенти със ЗД I, установява 3.6 пъти по-висока честота на смъртните случаи в изследваната кохорта спрямо общата популация. Проучването посочва, че при пациенти с диабет, повишената скорост на албуминова екскреция (AER) и намалената скорост на гломерулна филтрация (GFR) са фактори, увеличаващи риска от смърт. Наблюдава се независима и степенна връзка между наличието, тежестта на бъбречното

заболяване и смъртността при лицата със ЗД (83). На фона на увеличаващото се глобално разпространение на ЗД и повишение на броя на пациентите, нуждаещи се от хемодиализа или бъбречна трансплантация сред тази популация, United States Renal Data System отчита понижение на честотата на заболяемост от ТБН сред пациентите с диабет. За периода от 000, но при повишение на абсолютния брой пациенти със ЗД, които се нуждаят от хемодиализа или бъбречна трансплантация, от 42 236 на 53 382. Усилията за превенция на рисковите фактори за бъбречно увреждане, както и подобрените грижи за диабетно болните, могат да обяснят тези тенденции. Ранното откриване и по-доброто управление на ХБЗ при лица със ЗД може да забавят прогресията му до терминална бъбречна недостатъчност и да предотвратят сърдечно-съдовите усложнения [38].

1.2. Определение и класификация на ЗД

Захарният диабет е метаболитно заболяване, характеризиращо се с хипергликемия, която е резултат от нарушение на инсулиновата секреция, на инсулиновото действие или на двете заедно. Критериите за поставяне на диагнозата ЗД са: плазмена глюкоза на гладно ≥ 7.0 плазмена глюкоза на 2-я час в хода на орален глюкозо-толерантен тест ≥ 11.1 mmol/L, HbA1c $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol), произволно измерена плазмена глюкоза ≥ 11.1 mmol/L при наличие на симптоми на хипергликемия. Ако повишените стойности се констатират при лица без клинични симптоми на ЗД, се препоръчва повторно тестване [4, 8].

Класификацията на ЗД се основа предимно на етиологията на заболяването и разграничава следните типове ЗД. Захарен диабет тип I (ЗД I) – резултат на бета-клетъчна деструкция, водеща до абсолютен инсулинов дефицит. Захарен диабет тип II (ЗД II) – резултат от прогресиращ инсулинов секреторен дефект на фона на инсулинова резистентност. Хибридни форми на ЗД – бавно развиващ се имуномедиран диабет при възрастни и тип II ЗД с предразположение към кетоацидоза. Други специфични типове ЗД: моногенен диабет – моногенни дефекти на функцията на β -клетките и моногенни дефекти в инсулиновото действие, болести на екзокринния панкреас, ендокринопатии, индуциран от лекарства или химични съединения, диабет, свързан с инфекция, специфични форми на имуномедиран диабет, други генетични синдроми, асоциирани с диабет. Некласифициран ЗД – тази категория трябва да се използва временно, когато няма ясни диагностични критерии. Хипергликемия, открита за първи път по време на бременност – захарен диабет, установен през бременността и гестационен захарен диабет [4, 204].

1.3. Критерии за диагностика и класификация на ХБЗ и ДБЗ

ХБЗ се характеризира с отклонения в бъбречната структура и функция, налични за период

от над 3 месеца, с последици за здравето. Критерий за поставяне на диагнозата ХБЗ е наличие на едно от следните нарушения за период от 3 месеца – повишена скорост на албуминова екскреция (AER – Albumin excretion rate) или повишено съотношение албумин/креатинин нарушения от тубулен произход, наличие на хистологична диагноза, структурни промени, открити при образна диагностика, анамнеза за бъбречна трансплантация или намалена скорост на гломерулна филтрация (GFR – glomerular filtration rate) $GFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Според препоръките на Международната асоциация по нефрология от 2012 г., ХБЗ се класифицират въз основа на етиологията, GFR и AER/ACR. Стратификацията на риска от прогресия и прогнозата на ХБЗ се основават на GFR, AER/ACR, етиологията на ХБЗ и наличието на други рискови фактори и придружаващи заболявания (Табл.1 и Табл.2) [108].

Таблица 1. Класификация спрямо GFR

Категория		Терминология
G1	>90	нормална или леко повишена
G2	60-89	леко намалена
G3a	45-59	леко до умерено намалена
G3b	30-44	умерено до силно намалена
G4	15-29	силно намалена
G5	<15	много силно намалена

Таблица 2. Класификация спрямо AER/ACR

Категория	AER(mg/24h)	ACR(mg/mmol)	Терминология
A1			нормална до леко повишена
A2			умерено повишена
A3			силно повишена

Диабетната бъбречна болест е ХБЗ, свързано със ЗД. Диабетната бъбречна болест или диабетното бъбречно заболяване (ДБЗ) е клиничен синдром, характеризиращ се с персистираща повишена AER или повишено ACR, с понижена GFR, повишено артериално кръвно налягане и повишена сърдечно-съдова заболеваемост (ССЗ) и смъртност. Поради вариабилност в екскрецията на албумин с урината, е необходимо поне две от три изследвания за период от 3 – 6 месеца да са извън референтните граници [1, 8]. Диабетната гломерулопатия е характерната патоморфологична лезия при диабетна нефропатия (ДН), въпреки това само малка част от пациентите са биопсирани. Терминът ДБЗ е предпочитан при диабетици, при които са налице клинични признаци за бъбречно увреждане от ЗД. Терминът ДН се препоръчва при пациенти със ЗД с хистологично потвърждение на бъбречно увреждане от

диабета [67]. В препоръките на KDIGO 2020 – Clinical Practice Guideline for Diabetes класифицира спрямо критериите за ХБЗ [109].

Обединеният комитет по диабетна нефропатия в Япония (JCDN) представя през 2014 г. класификация на ДН, чиято ревизия е в съответствие с класификацията на KDIGO на ХБЗ от г. Акцентът е поставен върху диференциалната диагноза на ДН спрямо недиабетното бъбречно заболяване (НДБЗ). Обединеният комитет определя преразгледаната класификация като „Класификация на диабетната нефропатия 2014 г." (Табл.3) [172].

Таблица 3. Класификация на диабетната нефропатия – 2014 г (JCDN)

Стадий	A	G	Терминология
Стадий I	ACR<30	>30	пренефропатия
Стадий II	ACR-30-300	>30	начална нефропатия
Стадий III	A	>30	изявена нефропатия
Стадий IV	независимо от ACR/PCR		бъбречна недостатъчност
Стадий V	нужда от бъбречно-заместителна терапия		ТБН

1.4. Рискови фактори за развитие на ДБЗ

Разнообразие от рискови фактори участват в развитието и прогресията на ДБЗ. Те могат да бъдат класифицирани в две групи според възможността за тяхното модифициране. Рисковите фактори за ДБЗ, които могат да бъдат регулирани са: хипергликемия и лош гликемичен контрол, повишено артериално налягане, дислипидемия, затлъстяване, тютюнопушене, оксидативен стрес, субклинично възпаление, повишена АЕR и др. Рисковите фактори за ЗД, които не могат да бъдат повлияни са: дълга продължителност на диабета, генетични фактори, етническа принадлежност, възраст, женски пол, ретинопатия, гломерулна хиперфилтрация и др. [189]. Jitraknatee J. et al. (2020) оценяват влиянието на рисковите фактори за развитието на ДБЗ при пациенти със ЗД II. Шестте независими значими рискови фактори, които авторите цитират са: възраст, ретинопатия, повишена АЕR, HbA1c \geq 7%, анемия и пикочна киселина $>$ 446 μ mol/L [103]. DCCT/EDIC (2019) докладват, че патологичните стойности на HbA1c и триглицериди, повишеното систолно артериално налягане и напредналата възраст са най-значимите рискови фактори за развитието на ДБЗ при пациенти със ЗД I [155]. Стриктното управление на модифицируемите рискови фактори и ранното диагностициране на ДБЗ са от съществено значение за предотвратяване и забавяне прогресията на бъбречното увреждане при пациентите със ЗД [189].

1.5. Патоморфологични промени в тубулоинтерстициума при ДН

Характерните морфологични промени при ДН включват задебеляване на гломерулната базална мембрана, мезангиална експанзия, хиализиране на аферентната и еферентната артериола, редуциране на числената плътност на подоцитите, нодуларна или дифузна гломерулосклероза и др. [82]. През 2010 г. група от международни експерти разработват консенсусна класификация на ДН, чиято цел е да оцени тежестта на лезиите при пациенти със ЗД I и II. Тя установява минимален стандарт за качество за оценяване на биопсиите. Тежестта на лезиите се класифицират според участието на гломерулите в четири класа:

- Клас I: задебеляване на гломерулната базална мембрана;
- Клас II: мезангиално разширение, леко (IIa) или тежко (IIb);
- Клас III: нодуларна склероза (лезии на Kimmelsteil-Willsn);
- Клас IV: напреднала дифузна диабетна гломерулосклероза.

Степента на интерстициална фиброза, интерстициално възпаление, артериоларна хиалиноза и артериосклероза също се оценяват. Тези резултати обаче не се вземат предвид при окончателното класифициране на ДН. Интерстициалната фиброза и тубуларната атрофия се оценяват с полуколичествена скала и се изчислява индекс IFTA-score [180]. Okada T. et al. посочват, че интерстициалната фиброза, тубуларната атрофия и интерстициалното възпаление при пациенти с ДН са основни фактори, свързани с бъбречната прогноза и развитието на ТБН [148]. Mise K et al. (2015) доказват предиктивната роля на IFTA-score за оценка на риска от прогресия на бъбречните усложнения при пациенти със ЗД [131]. Hoshino разработват система за стратификация на риска при пациенти с ДН, основана на характерните патоморфологични промени, която включва както гломерулни, така и тубулоинтерстициални лезии [95].

Тези проучвания акцентират върху ролята на тубуларното увреждане в патофизиологията и прогресията на ДН. Хистологични промени в тубулоинтерстициума, които могат да се наблюдават при ДН са тубуло-епителна клетъчна хипертрофия, задебеляване на тубуларната базалната мембрана, епително-мезенхимен преход, натрупване на гликоген, тубулоинтерстициална фиброза и тубуларна атрофия [158]. Една от най-ранните структурни промени в диабетния бъбрек, наблюдавана само няколко дни след началото на хипергликемията, е хипертрофията и хиперплазията на кортикалните тубули. Проучванията показват, че при плъхове с индуциран от стрептозотозин диабет се наблюдава 15% увеличение на теглото на целия бъбрек в рамките на 72 часа. По-голяма част от увеличението на кортикалната маса се дължи на хипертрофия на проксималните епителни клетки. Тази структурна промяна е ограничена до кората и външната медула. Тубуларната епителна хипертрофия се последва от атрофия и тубулоинтерстициална фиброза. Ранната хипертрофия

на тубуларните клетки може директно да стимулира тяхната апоптоза, чрез блокиране на клетките във фаза G1 на клетъчния цикъл, което удължава експозицията на токсичните фактори и намалява възможността им за пролиферация [181]. Проучване, оценяващо наличието на атубуларни гломерули при пациенти със ЗД I, установява, че до 17% от гломерулите при изследваните пациентите са атубуларни и 51% са прикрепени към атрофични тубули [140]. Задебеляването на тубуларната базалната мембрана е характерна патоморфологична находка при ДН, която може да се наблюдава и при пациенти с нормална албуминова екскреция. Ширината на тубуларната базалната мембрана при пациенти със ЗД корелира с удебеляването на гломерулната базална мембрана и мезангиалната експанзия. Някои проучвания посочват, че задебеляването на тубуларната базалната мембрана може да е по-добър индикатор за тежестта на ДН, отколкото задебеляването на гломерулната базална мембрана. В допълнение, задебеляването на тубуларната базалната мембрана е първично, а не вторично увреждане, индуцирано от гломерулната патология. При ДН бъбречните тубуларни клетки губят епителния си фенотип и придобиват характеристики на мезенхимна клетка – тубуларен епително-мезенхимен преход. По време на епително-мезенхимен преход епителните клетки губят апикално-базалната си поляризираност, както и някои мембранни протеини като e-cadherin в zonula occludens, формиращи плътните връзки в парацелуларното пространство. Епителните клетки се преобразуват в миофибробласти, които експресират мезенхимни маркери като α -гладкомускулен актин и виментин. Миофибробластите се смятат за основните клетки, отговорни за производството и натрупването на интерстициален матрикс и за развитието на тубулоинтерстициална фиброза. При ДН се установяват acid-плътни тела. Тези лизозоми съдържат многослойни включвания от фосфолипидни мембрани, получени от увредените клетъчни органели. Въпреки че наличието им корелира с реналното увреждане, има малко информация за тяхната роля в развитието и прогресията на ДН [181]. Друго характерно патоморфологично изменение при ДН са лезиите на Armanni-Ebstein, резултат от селективното натрупване на гликоген в епителните клетки. Представят се като вакуоли, оцветяващи се PAS-положително в цитоплазмата на тубуларните епителни клетки. Лезиите на Armanni-Ebstein са описани при пациенти с лошо контролиран диабет и диабетна кетоацидоза, подобни лезии се съобщават при пациенти със синдром на Fanconi и алкохолна кетоацидоза [217].

1.6. Патогенеза на тубулоинтерстициалните промени при ДН

Патогенезата на ДН е сложна и многофакторна, в развитието ѝ участват хемодинамични и метаболитни фактори [113]. Епителните клетки са подложени на редица дисфункционални

промени, индуцирани от хипергликемията и/или инсулиновия дефицит като хипоксия, оксидативен стрес, възпаление, фиброза и апоптоза [66].

Склонността на епителните клетки към хипоксично увреждане при ЗД може да се отдаде на три фактора: повишена метаболитната активност в резултат на високите енергоемки процеси на реабсорбция на натрий и глюконеогенеза, нарушена утилизация на O_2 поради митохондриална дисфункция и намалена доставка на O_2 поради микросъдова ангиопатия каналчета. Около 60% от енергията се изразходва за реабсорбция на Na^+ в проксималните тубули чрез активен транспорт от Na^+-K^+-ATP -аза, разположена на базолатералната мембрана на епителните клетки. Концентрационните градиенти, които тази йонна помпа генерира, създават възможност и за вторично активен транспорт. Глюкозата навлиза в проксималните епителни клетки чрез натриево-глюкозен котранспортер (SGLT – sodium-glucose co-ATP-аза. В условия на хипергликемия е увеличена реабсорбцията на глюкоза, което води до повишен енергоразход и кислородна консумация от проксималните епителни клетки. Ихибиторите на SGLT-2 подобряват индуцираната от ЗД хипоксия и ограничават развитието на апоптоза в проксималния епител [44]. Бъбреците са важен орган в регулацията на глюкозната хомеостаза, както чрез реабсорбция на филтрираната глюкоза, така и чрез процес на глюконеогенеза. При физиологични условия инсулинът инхибира синтеза на глюкоза от невъгледриатни източници. Степента на бъбречната глюконеогенеза се увеличава значимо при ЗД в сравнение със здрави лица, повишението е приблизително три пъти на гладно. Глюконеогенезата е енергозависим процес, изискващ шест енергийни молекули (4 АТР, 2 GTP) за синтезиране на една молекула глюкоза. Повишената активност на този метаболитен път при ЗД е предпоставка за хипоксично увреждане в проксималните епителни клетки [80].

Проксималните епителни клетки са богати на митохондрии, в тези органели се извършва окислително фосфорилиране чрез β -окисление на мастни киселини, генериращо АТФ. Високите енергоемки процеси при ЗД увеличават риска от образуване на реактивни кислородни радикали (ROS – Reactive oxygen species). Нивото на ROS при ЗД може да надвиши капацитета на местните антиоксидантни системи и да доведе до митохондриални увреждания. Coughlan MT et al. (2016) установяват митохондриална фрагментация и нарушено образуване на АТФ в проксималните тубуларни клетки 4 седмици след индуциран диабет, като тези промени предхождат повишената албуминова екскреция и анормалната гломерулна морфология. Тези данни показват, че промените в митохондриалната дисфункция, предизвикани от оксидативния стрес, могат да бъдат първична и основна причина за развитието на ДН [50]. Проучване на Yang SK et al. (2019), оценява ролята на антиоксидантния

пептид SS31 при пациенти с ДН и акцентира върху терапевтичния потенциал на средства, регулиращи митохондриалната функция и производството на ROS в лечението и профилактиката на реналните тубулоинтерстициални увреждания при ЗД [213].

В условия на хипергликемия и инсулинов дефицит метаболитните пътища на глюкозата се променя в две основни насоки – ензимен и неензимен. Неензимното гликиране на белтъци е причина за трайни и необратими изменения в структурата и функцията на аминокислотите. При пациенти с ДН са установени приблизително два пъти повече продукти на напредналото гликиране (AGEs – Advanced glycation end products) в тъканите, отколкото при пациенти с диабет без бъбречно заболяване, което се дължи на повишеното формиране и намаления клирънс на AGEs. AGEs могат да причинят увреждане чрез различни механизми като гликиране на структурни протеини, освобождаване на кислородни радикали, промяна в активност на ензими, рецептори и регулаторни протеини, нарушение на сигнални пътища, нарушение в протеолизата на протеини и индуциране на имунен отговор [3]. Ефектите от AGEs могат да бъдат класифицирани като независими или рецептор-медиирани. AGEs стимулират експресията на редица цитокини, растежни фактори и хемоатрактанти, които имат роля в развитието на бъбречно увреждане при ЗД. Те индуцират синтеза на трансформиращ растежен фактор- β в мезангиалните и проксималните тубулни клетки, който е про-фиброгенен и играе важна роля в патогенезата на гломерулосклерозата и тубулоинтерстициалната фиброза при ДН. AGEs са лиганди за рецептора RAGE, който представлява трансмембранен рецептор за предаване на сигнали. Това взаимодействие

и
н
д
у
ц
и
р
а

а
к

1.7. Роля на тубулите в развитието на ДБЗ

Все повече данни сочат, че функционални и структурни промени в тубулите и кортикалния интерстициум могат да предшестват патогномичните изменения в гломерула и да инициират развитието и прогресията на бъбречната дисфункция при ЗД. Това предполага промяна в традиционната парадигма за патогенезата на ДБЗ – от гломерулоцентрична към

ц
и
я

тубулоцентрична хипотеза [66].

Една от първите прояви на ДБЗ е гломерулната хиперфилтрация, за чието развитие основна роля има тубуло-гломерулната обратна връзка. Повишените нива на филтрирана глюкоза при пациенти със ЗД водят до увеличената ѝ реабсорбция от проксималните тубули. Глюкозата навлиза в проксималните епителни клетки чрез натриево-глюкозен котранспортер. Следователно, реабсорбцията на глюкоза води и до паралелно намаление на нивата на натрий в тубуларната течност. Понижената концентрация на NaCl се регистрира от macula densa и индуцира гломерулна хиперфилтрация чрез аферентна артериоларна вазодилатация, повишен бъбречен кръвоток и хиперфилтрация. При пациенти със ЗД се наблюдава хипертрофия и хиперплазия на проксималните епителни клетки, което допълнително потенцира патологичния ефект на тубуло-гломерулната обратна връзка [194]. Vallon V et al. (2014) отчитат понижаване на гломерулната хиперфилтрация след инхибиране на реабсорбцията на глюкоза в проксималните тубули при мишки с диабет [193]. Клиничната значимост на тубуло-гломерулната обратна връзка при пациенти със ЗД се демонстрира от способността на SGLT-2-инхибитори да подобряват бъбречната функция при пациенти с ДБЗ. Клинични проучвания показват, че инхибирането на SGLT-2, и ангиотензин II има ренопротективен ефект при пациенти със ЗД II с базален eGFR > 30 mL/min/1.73 m² [200].

Най-характерната проява на ДБЗ е албуминурията. Както гломерулна така и тубулна увреждания имат роля в развитието на протеинурията. Реабсорбцията на протеини в тубулите се осъществява от многолигандния ендоцитен рецептор мегалин/кубилин. Той е силно експресиран в епителните клетки на проксималните тубули, където реабсорбира протеините посредством рецептор-медирана ендоцитоза. Постъпилият чрез ендоцитоза белтък се насочва или към кръвообращението, чрез FcRn (neonatal Fc receptor) медирана трансцитоза, или към лизозомите, където се разгражда до по-малки пептиди [90]. Редица проучвания подчертават ролята на тубулното увреждане в развитието и прогресията на протеинурията при ЗД. Изследвания върху животни са установили, че албуминурията е силно чувствителен маркер за ранна тубуларна токсичност при липса на гломерулна патология. Tojo A et al. (2001) описват, че при плъхове с индуциран от стрептозотоцин диабет се наблюдава намаление на тубуларната реабсорбция на албумин в сравнение с контролни плъхове. Те не установяват разлика в гломерулната филтрация на протеина между двете групи. Проучването показва, че проксималната тубуларна реабсорбция на албумин намалява без да се увеличава гломерулната му филтрация в ранните стадии на ДБЗ. Това може да бъде обяснено с намалена албуминова ендоцитоза или с намалена експресия на рецептора мегалин/кубилин [183]. Според „хипотеза за извличане“ гломерулите филтрират високи нива на албумин, който се появява в урината в патологично количество, само ако настъпи нарушение в тубуларната реабсорбция [49]. Russo

отчитат много по-висок glomerular sieving coefficient (GSC) на албумин – 0.034, при плъхове след натоварване с флуоресцентно маркиран албумин. Инжектирането на маркиран албумин при плъхове води до увеличение на гломерулната му филтрация 50 пъти, но е последвано от бърза реабсорбция в проксималния тубул чрез трансцитоза. При плъхове с нефротичен синдром скоростта на усвояване на албумин от проксималните тубули е значително намалена скоростта на екскреция на албумин. След екзогенно натоварване с албумин, те констатираат намалена реабсорбция от проксималните тубули. В модела, водещ до ендогенна албуминурия, който предизвиква повишена експозиция на проксималните тубули към протеина, се наблюдава повишена реабсорбция. Те предполагат наличие на регулаторна система за реабсорбция на албумин в проксималните епителни клетки, която може бързо да реагира на различни физиологични условия и да сведе до минимум промените в нивото на серумния албумин [198]. Mori KP et al. (2017) демонстрират, че при инхибиране експресията на мегалин чрез тамоксифен при мишки, се наблюдава значимо увеличение на протеинурията. Сравнявайки лекуваните с тамоксифен диабетни и здрави мишки, те изчисляват, че развитието на диабет води до 1.9-кратно увеличение на общата филтрация и 1.8-кратно увеличение на реабсорбцията на албумин, но при значимо намаление на ефективността на реабсорбцията (86% ефективност при диабет срещу 96% ефективност при здрави). Лечението с инсулин при мишките с индуциран диабет редуцира нивата на албуминова филтрация до тези на контролната група [136]. Албуминът се реабсорбира чрез рецептор-медирана ендоцитоза, освобождаването на лиганда от рецептора зависи от намалението на рН в ендозомата. Ангиотензин II блокира H^+ -АТФ-аза, което води до понижена реабсорбция на албумин. Съобщава се, че инхибиторите на ренин-ангиотензиновата система възстановяват експресията на мегалин и подобряват тубуларната реабсорбцията на албумин при плъхове с диабет [184].

Персистиращата протеинурията е причина за прогресивно увреждане на бъбречния паренхим, което може да ускори развитието на ДБЗ. Патологичната гломерулна филтрация на белтък води до увеличена тубуларна реабсорбция и натрупване на протеини в ендолизозомите, което активира възпалителни пътища в проксималните епителни клетки. Следователно проксималният тубул потенцира тубулоинтерстициалното възпаление и фиброза [216]. Nielsen R et al. (2013) демонстрират в модел върху мишки, че при протеиново натоварване на епителните клетки се повишава синтезата на лизозомни протеолитични ензими. Следователно лизозомната протеолиза представлява адаптивен отговор към увеличено натоварване с протеин на епителните клетки, целящ да намали тубуларната токсичност на протеинурията [143].

Основна роля в развитието на протеинурията при ЗД има така наречения ретрограден трафик, опосредстван от sirtuin-NMN-claudin. В норма, синтезираният от проксималните тубули белтък sirtuin, регулира образуването на медиатора nicotinamide mononucleotide, който дифундира до подоцитите и потиска експресията на протеина claudin-1. Claudin-1 конкурентно инхибира производството на нефрин и подоцин, които са важни компоненти на плътните връзки между подоцитите. Hasegawa K et al. (2013) демонстрират, че при мишки с диабет, експресията на белтъка sirtuin от проксималния тубул намалява, което е причина за понижена синтеза на nicotinamide mononucleotide. В отсъствието на nicotinamide, експресията на claudin-1 е повишена, което причинява промени в подоцитите и развитието на албуминурия [88]. Механизмът, водещ до намален синтез на sirtuin при пациенти със ЗД, не е напълно разяснен, но се смята че високите нива на глюкоза инициират интрацелуларни сигнални пътища, опосредствани от GLUT-2-importin- α 1/HNF1 α , които намаляват съотношението NAD/NADH и понижават експресията на sirtuin от епителните клетки [89,

1.8. Роля на GFR и ACR/AER в диагностиката на ХБЗ и ДБЗ

Според препоръките на Международната асоциация по нефрология от 2012 г., ХБЗ се класифицира въз основа на етиологията, GFR и AER/ACR. Стратификацията на риска от прогресия и прогнозата на ХБЗ се основава на GFR, AER/ACR, етиологията на ХБЗ и наличието на други рискови фактори и придружаващи заболявания [108].

GFR е лабораторен маркер, оценяващ бъбречната функция, и критерий за класификация на ХБЗ, спрямо който реналното увреждане се категоризира в 6 стадия – G1–G5. KDIGO 2012 препоръчва при пациенти с ХБЗ, GFR да се определя поне веднъж годишно, по-чест мониторинг е необходим при лица с по-висок риск от прогресия на ХБЗ и/или когато очакваните стойности на GFR ще повлияят на терапевтичните решения. „Златен стандарт“ в определянето на GFR е измерване клирънса на екзогенната субстанция инулин, по време на непрекъсната интравенозна инфузия. Този метод е инвазивен, трудоемък и не се прилага в рутинната практика [108]. Към момента най-често за оценка GFR се използват креатинин базирани формули като MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), СКД-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) и формулата Bedside Schwartz при деца. Формулите за изчисление на GFR (eGFR) – MDRD и СКД-EPI, са базирани на концентрацията на серумен креатинин, определен с метод, чиято калибрация е проследима до референтен метод – isotopic dilution mass spectrometry (ID-MS). Те включват променливи величини, зависещи от възрастта, пола и етническа принадлежност [112]. СКД-EPI демонстрира значително по-голяма точност от MDRD при изчисление на eGFR в подгрупата

с $GFR > 90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Следователно, СКД-ЕПІ е предпочитана при пациенти със ЗД, тъй като най-ранната хемодинамична аномалия е гломерулната хиперфилтрация с повишение на $GFR > 120 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ [122].

Актуализираната формула Bedside Schwartz от 2009 г. се препоръчва при изчисление на при деца. Тя включва концентрация на серумен креатинин, измерен с метод проследим до и височината на изследваното лице. Формула Bedside Schwartz е валидирана при деца с ХБЗ с диапазон на GFR от 15 до $75 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ [168]. Алтернативни формули представят Pottel – FAS, и Björk J et al. (2021) – СКД-ЕПІ40, изведени сред големи кохорти от деца. Формулата FAS използва нормализирана стойност на серумния креатинин спрямо възрастта и височината, а формулата СКД-ЕПІ40 е базирана на уравнението СКД-ЕПІ, но с коригиран спрямо възрастта серумен креатинин. Въпреки че резултатите от двете проучвания са обещаващи, е необходимо да се натрупат допълнителни данни, за да се оцени тяхната клинична приложимост в различни педиатрични популации преди да бъдат валидирани за рутинната практика [30, 157].

критерий за стратификация на риска от прогресия на ХБЗ. Lambers Heerspink HJ et al. (2014) посочват, че понижението на $eGFR$ с $> 40\%$ при пациенти с ХБЗ повишава риска от развитието на ТБН с 20.3 пъти, спрямо пациентите без промяна в $eGFR$ [117]. Проучването ADVANCE-ON констатира, че намаление на $eGFR$ при пациенти със ЗД се асоциира с бъдещ риск от бъбречни и сърдечно-съдови усложнения и смъртност [150].

е критерий за диагностика и стадиране на ХБЗ, според стойността на АЕР/АСР пациентите се класифицират в три категории – А1–А3. Методите за оценка на албуминурия включват: определяне АЕР в диурезна урина и измерване на АСР в единична порция урина (spot) [108]. Към момента АЕР/АСР е най-ранният лабораторен маркер за наличието на ДБЗ, критерий за класификация на ДБЗ и предиктор на кардиоваскуларните усложнения. Наличието ДБЗ при пациенти със ЗД се констатира при повишени стойности на АЕР/АСР в две от три проби урина за период от 6 месеца. При пациентите със ЗД I скринингът за ДБЗ чрез изследване на При пациентите със ЗД тип II се препоръчва изследване на албуминовата екскреция от момента на поставяне на диагнозата, поради дългия латентен период между началото на заболяването и откриването му, след което веднъж годишно [8, 17]. Според работната група на KDIGO идеалната честота за скрининг и мониториране на ДБЗ, чрез АЕР/АСР остава неопределена и трябва да бъде индивидуализирана [134].

АЕР е показател, оценяващ риска от прогресия на ДБЗ, развитието на сърдечно-съдови усложнения и смъртността при пациенти със ЗД. Проучването ADVANCE-ON установява, че увеличението на АСР с повече от 30% в рамките на 2 години увеличава с 1.26 пъти риска от

възникване на значими макроваскуларни инциденти, ТБН и обща смъртност [104]. Проучване, проведено от DCCT/EDIC (2016), посочва, че пациентите със ЗД I с умерено повишена AER имат 1.7 пъти по-висок риск от развитие на сърдечно-съдови заболявания (ССЗ), в сравнение с пациентите с нормална AER. Този риск се увеличава до 2.65 пъти при пациентите със силно повишена AER [56]. Carrero JJ et al. (2017) посочват, че 4-кратното увеличение на ACR е свързано с 3.08 пъти по-висок риск от развитие на ТБН, докато 4-кратно намаляване на ACR е свързано с намаление на риска с 0.34 пъти [42].

Естественият ход на бъбречното увреждане при диабет е по-добре описан при ЗД I, тъй като заболяването се диагностицира с неговата поява. Първият клиничен признак за бъбречно засягане, дължащ се на ЗД е гломерулната хиперфилтрация, повишението на GFR може да надвишава 120 mL/min/1.73 m². При някои пациенти хиперфилтрацията е последвана от развитие на повишена албуминова екскреция. При пациенти със ЗД I рядко се констатира повишен AER през първите 5 години. Без терапевтична намеса 80% от пациенти със ЗД I, които имат умерено повишен AER, развиват силно повишен AER и артериална хипертония за период от 10 – 15 години. След като е налице албуминурия, скоростта на гломерулна филтрация намалява прогресивно с променлива скорост. Естественият ход на ДБЗ при ЗД II е по-слабо описан, тъй като ЗД се диагностицира години след неговото начало. При част от пациентите със ЗД II е налице повишена AER по време на диагнозата. Без терапевтична намеса от 20% до 40% от пациентите със ЗД II развиват силно повишен ACR и понижение на

1.9. Ограничения на eGFR и AER/ACR в диагностиката на ДБЗ

GFR и AER са основни критерии за диагноза и класификация на ХБЗ, но показват известни ограничения. Оценката на бъбречната функция чрез скоростта на гломерулна филтрация е от съществено значение за идентифициране и мониториране на ДБЗ. Директното измерване на GFR чрез креатининовият клирънс не се използва широко с оглед трудното и неточно събиране на диурезна урина и влиянието на редица лекарствени средства, инхибиращи тубуларната секреция на креатинин или намаляващи реналната перфузия. Изчислената eGFR, чрез формулите MDRD и СКD-EPI демонстрира необходимата точност в подгрупата с GFR < стойности на GFR, като отчитат по-ниски резултати [121]. Сравнителен анализ между двете най-често използвани формули показва, че СКD-EPI демонстрира значително по-голяма точност от MDRD, при изчисление на eGFR в подгрупата с eGFR > 90 mL/min/1.73 m² [122]. Уравненията на СКD-EPI и MDRD в сравнение с измерената скорост на гломерулна

филтрация с $^{51}\text{Cr-EDTA}$. Те посочват, че понижението на изчислената eGFR с СКД-ЕПІ и MDRD е по-значимо при пациенти със ЗД в сравнение със здрави индивиди. Това би причинило значителен проблем в диагностиката на ДБЗ, особено в ранните стадии на ДБЗ, когато може да се наблюдава гломерулната хиперфилтрация [40]. MDRD и СКД-ЕПІ имат стойност на P30 между 80% и 90%, което означава, че eGFR, генериран от тези формули, има 90% шанс да бъде в рамките на $\pm 30\%$ от реалната GFR [187].

Формулата Bedside Schwartz е валидирана при деца с ХБЗ с диапазон на GFR от 15 до 75 и сравнена с измерен с iohexol-GFR. Стойностите на eGFR, получени от тази формула, имат P30 $\sim 80\%$ и P10 $\sim 37\%$. Тези данни посочват ограниченията в използването на формулата в ранните фази на ДБЗ, когато се очаква гломерулна хиперфилтрация и стойности на GFR. Редица проучвания оценяват диагностичната надеждност и клинична приложимост на формулата при деца с GFR $>75 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, представяйки противоречиви резултати [129]. оценяват възпроизводимостта на резултатите за eGFR, изчислени с 6 различни формули, спрямо стойностите на измерения креатининов клирънс при деца и възрастни със ЗД I. Те посочват лоша сравнимост и обобщават, че към момента липсва идеална формула за изчисление на eGFR при пациенти със ЗД I и препоръчват внимателна интерпретация на резултатите, генерирани от формулите за eGFR при тази група пациенти [31]. Концентрацията на серумния креатинин, която се използва в изчислението на eGFR, се влияе от мускулната маса и диетичния режим. Състояния и заболявания, водещи до вариация в мускулната маса и хранителния прием са причина за неточност в измерването на eGFR. Някои медикаменти като нестероидни противовъзпалителни средства или инхибитори на ангиотензин-конвертиращ ензим (АСЕ-инхибитори) могат да намалят реналната перфузия и да причинят понижение на eGFR. АСЕ-инхибиторите са широко употребявани нефропротективни медикаменти при пациенти с ДБЗ, стартирането на лечение с тях води до понижение на eGFR [187].

Повишената АЕР често е първият клиничен индикатор за наличието на ДБЗ, но не винаги предхожда влошаване на бъбречната функция, оценена с понижението на GFR. Редица проучвания посочват развитие на ДБЗ при пациенти с нормална АЕР. В третото национално проучване NHANES III е установена нормална стойност на АСР при 34% от пациенти със ЗД с GFR $< 30 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ [78]. Проспективно проучване при пациенти със ЗД II констатира, че само 49% от пациентите с бъбречно увреждане, дефинирано като GFR $\leq 60 \text{ mL/min/1.73}$ патологична стойност на АСР при 53% от пациентите със ЗД тип II с eGFR $< 75 \text{ mL/min/1.73}$ скринингови и терапевтични стратегии [119]. В своето проучване Tuttle Thorn LM et al. (2015)

обобщават, че честотата на не-албуминуричното ХБЗ сред пациенти със ЗД I е 2%. Появата на не-албуминуричното ХБЗ е свързано с увеличение на риска от сърдечно-съдови инциденти и обща смъртност сред лицата със ЗД I, което изисква насочен терапевтичен подход за превенция на кардио-васкуларната заболяемост при тази група пациенти. Най-висок риск от сърдечно-съдови и бъбречни усложнения е установен при диабетичите с повишена стойност на ACR [188]. Регистрирането на повишена AER при пациенти със ЗД увеличава риска от прогресия на бъбречното увреждане, но интензивният гликемичен контрол, пониското АН и по-благоприятният липиден профил, могат да ограничат развитието на ДБЗ. Проспективно проучване на DCCT/EDIC (2011), проследяващо пациенти със ЗД I със среден период на проследяването 13 години, установява, че 117 от 299 от пациентите с повишена към нормална AER е 40% [55]. Трайно нормализиране на умерено повишената скорост на албуминова екскреция е три пъти по-вероятно при пациентите с HbA1c < 8%, систолно артериално налягане < 115 mmHg, общ холестерол < 5.12 mmol/L и триглицериди < 1.6

Съществуват значителни вариации (до 40%) на албуминурията в хода на деня при един и същ пациент. Албуминовата екскреция може да се повиши преходно при физиологични състояния като физическо натоварване, високо белтъчна диета, излагане на ниски температури и др. С оглед тази вариабилност в екскрецията на албумин, е необходимо поне две от три изследвания за период от 3 – 6 месеца да са извън референтните граници, за да се констатира повишена AER. Редица патологични причини извън ДБЗ като фебрилитет, повишено артериално налягане, сърдечна недостатъчност, гломерулни и тубуларни увреждания, инфекции на пикочните пътища и др. могат да доведат до повишена екскреция на албумин. Според американската диабетна асоциация (ADA) диагнозата ДБЗ е по-малко вероятна при пациенти със ЗД със следните симптоми: бързо намаляваща eGFR, бързо нарастваща протеинурия или нефротичен синдром, рефрактерна хипертония, признаци или симптоми на друго системно заболяване, > 30% намаление на GFR в рамките на 2 – 3 месеца след започване на ACE-инхибитор, патологичен уринен седимент, липсата на ретинопатия. Наличието на тези симптоми при пациенти със ЗД налага търсенето и на друга причина извън ДБЗ [187].

Количественото измерване на албумин в урината не е стандартизирано и показва значителна неточност. Bachmann LM et al. (2014), оценяват точността на 17 от най-често срещаните методи за анализ на албумин в урината спрямо ID-MS и установяват комбинирана неточност за част от методите > 10%, дължаща се на bias. Те посочват необходимост от стандартизация с цел междулабораторна сравнимост [24].

С оглед ограниченията на AER/ACR и eGFR е необходимо въвеждането и валидирането на нови маркери в диагностиката на ДБЗ. Такъв потенциален показател може да бъде

т

у
б Неутрофил гелатиназа-асоциирания липокалин (NGAL) принадлежи към семейството на липокалините. Той е малък секреторен протеин, характеризира се със способността да свързва хидрофобни молекули, наречени сидерофори. NGAL изпълнява различни функции: участва във вродения имунен отговор и медира клетъчната хомеостаза. NGAL първоначално е идентифициран във вторичните гранули на неутрофилите, по-късно е установена експресията от други тъкани, включително и от бъбречните тубули [32]. NGAL е показател за бъбречно структурно увреждане, очертава се като един от най-обещаващите тубуларни биомаркери в диагностиката на острите и хронични бъбречни заболявания. Увеличените стойности на NGAL в плазма (pNGAL) и урина (uNGAL) индикират степента на субклинична тубуларна увреда и се явяват по-ранни маркери за настъпването на бъбречна дисфункция от класическите гломерулни показатели [2, 32, 85, 120]. Проучванията показват добър диагностичен профил на NGAL в диагностиката на ДБЗ при пациенти със ЗД I и ЗД II. pNGAL и uNGAL са определяни като ранни маркери за бъбречно увреждане, корелиращи с тежестта и прогресията на ДБЗ, с гликемичния и метаболитен контрол и с риска от развитие на ТБН при пациенти със ЗД [18, 33, 86, 126, 138, 147, 165, 221].

е

2.1. NGAL – структура

р познат като Lipocalin-2 (LCN-2), се среща в литературата още като 24p3, онкоген 24p3, инхибитор на фактор, стимулиращ миграцията, човешки неутрофилен липокалин, α 1-к микроглобулин свързан протеин, сидерокалин или утерокалин. Това е гликопротеин, кодиран от ген, разположен в хромозомен локус 9q34.11. Абревиатурата на неутрофил гелатиназа асоцииран липокалин при хората е „NGAL” (или LCN-2) с главни букви, за разлика от хомолозите при мишки и плъхове, които се означават с малки букви „Ngal” (или Lcn-2) [98].
н Ngal е изолиран за първи път при мишки от бъбречни клетки, инфектирани с вирус SV-40
е свързан с матрикс-металопротеиназа-9 (MMP9 - Matrix metalloproteinase-9), наричайки го α 2-у микроглобулин свързан протеин, поради идентичност с α 2-микроглобулина при плъхове
т

р

о

ф NGAL спада към семейството на липокалините. Липокалините са семейство от малки протеини, които имат обща функционална роля – участват в транспортирането на хидрофобни лиганди. Отделните протеини от това семейство показват ниска идентичност на
л

г

е

аминокиселинната последователност, в някои случаи по-малко от 20%, но те имат обща вторична и третична структура. Представителите на фамилията притежават три региона със значително структурно сходство, наречени short conservative regions (SCR) [72]. Липокалините се класифицират в две подсемейства – „kernel“ и „outlier“. Kernel липокалините притежават и трите SCR, докато „outlier“ – само един или два от SCR, но никога и трите. NGAL принадлежи към „kernel“ липокалините [15]. LCN-2 е изграден е от 178 АК, в 8 антипаралелни разположени β -вериги, свързани с α -хеликс. Те са аранжирани в бъчвообразна третична структура [48]. NGAL съдържа 20-аминокиселинен сигнален пептид в N-терминалния край на протеина и липокалинов домейн, съставляващ по-голямата част от дължината на молекулата. Липокалиновият домейн е характерна черта за липокалините, тъй като съдържа лиганд-свързващ регион, който свързва и транспортира малки липофилни лиганди. В сравнение с другите членове на семейството, лиганд-свързващият регион на LCN-2 съдържа по-полярни и положително заредени аминокиселинни остатъци [98].

NGAL съществува в различни форми: мономер от 25 kDa, димер от 46 kDa, хомотример от 70 kDa и като комплекс с MMP-9 от 92 kDa [98]. Всички форми на NGAL присъстват в плазма и урина, като бъбречните епителни клетки секретират главно мономерната форма, докато неутрофилите освобождават главно димерната форма [39]. В комплекса MMP-9-LCN-2 стабилизира протеиназата и я предпазва от разграждане и инактивиране от тъканния инхибитор на металопротеиназите [210].

– лиганди и рецептори

NGAL се свързва към различни видове дълговерижни ненаситени мастни киселини и метаболити на арахидонова киселина [34, 46]. Чрез кристалографски анализ Goetz DH et al. участието на протеина във вродения имунитет [81]. Сидерофорите са бактериални протеини, които свързват циркулиращото и вътреклетъчното свободно желязо и го доставят на микробните агенти. Сидерофорите са необходими за оцеляването на много микроорганизми в човешкото тяло [141]. NGAL има бактериостатичен ефект, тъй като свързва сидерофорите и ограничава доставката на желязо до микроорганизмите [93, 139]. Лигандите за NGAL са два основни класа хелатора на желязо: фенол/катехолатен тип – ентерохелин, продуциран от грам-отрицателните бактерии, и карбоксимикобактин, произвеждан от микобактерии като брой хидрофобни остатъци, което позволява образуването на по-голям брой водородни и Van подобни лиганди, открити в урината, са катехолите. Тези ендогенни лиганди контролират антибактериалната активност на NGAL. В зависимост от химичните характеристики на

урината катехолите могат да възпрепятстват свързването на комплекса сидерофор-желязо с NGAL и да потенцират бактериалния растеж [171].

Рецепторите за NGAL са два типа: 24p3R и мегалин/кубилин комплекс. 24p3R е ендоцитен рецептор, който се експресира върху повърхността на кардиомиоцитите и в бъбречните тубули. Имунооцветяването на бъбречната тъкан при животни показва експресия на 24p3R в апикалната мембрана на дисталните тубули и събирателните каналчета, но не и на проксималните тубули [63, 118]. Другият известен рецептор за NGAL е мегалин/кубилин. Той е многолиганден ендоцитен рецептор, експресиран от различни епителни клетки, като епитела на проксималните бъбречните тубули, илеума и хороидния плексус в мозъка. Мегалин принадлежи към семейството на липопротеиновите рецептори с ниска плътност и се свързва с различни липокалини. Въпреки това неговият афинитет към NGAL е по-висок, от този към другите липокалини [99]. След взаимодействие с рецептора NGAL навлиза в клетката като apoNGAL-самостоятелно или в комплекс с желязо и сидерофор като holoNGAL. Биологичната роля на NGAL зависи от молекулата, с която е в комплекс. ApoNGAL улавя вътреклетъчното желязо и го пренася в екстрацелуларното пространство, което при определени условия може да доведе до намалена пролиферация и апоптоза. HoloNGAL освобождава в цитоплазмата желязо, активирайки желязо-медираните пътища, водейки до повишена епителизация, пролиферация и инхибиране на метастазите. В комплекса MMP-2 проявява проонкогенни и проинвазивни свойства [62]. Devireddy LR et al. (2005) доказват, че в MDCK клетки или в трансфектирани с 24p3R-HeLa клетки, apo-NGAL индуцира апоптоза в резултат на изчерпване на вътреклетъчния железен басейн [63]. Присъствието на желязо, а не наличието на сидерофор, определя различните биологични ефекти на NGAL. Демонстрират върху метанефричен мезенхим при плъхове, че комплексът Ngal-ентерохелин-Fe проявява индуцираща епителизация активност, за разлика от apo-Ngal. Заместването на желязо с галий в комплекса намалява тази активност на Ngal [135]. Yang J et al. (2003) описват, че holoNGAL частично компенсира растежния дефицит на култивирани ембрионални бъбреци в отсъствието на трансферин [212].

2.3. NGAL – регулация на експресията и тъканна експресия

Експресията на NGAL се повлиява от редица молекули като цитокини, растежни фактори, хормони, витамини, минерали и синтетични лекарства. Сигнални пътища, регулиращи синтеза на NGAL, са NF- κ B и JNK (c-Jun N-terminal kinases). Основен фактор в регулацията на генната експресията на NGAL е NF- κ B-пътят. Семейството NF- κ B включва пет транскрипционни фактора: p50, p52, p65 (или RelA) и c-Rel и RelB. Транскрипционните фактори RelA, c-Rel и RelB активират генната експресия на NGAL, докато p50 и p52

инхибират генната експресия на протеина, освен ако не се свържат с друг транскрипционен фактор, съдържащ домейн за активиране на транскрипция в своя С-терминален край. Агенти, които активират NF-κB пътя и индуцират положително експресията на NGAL, са цитокини като интерлевкин-1β, хормони като инсулин или бактериални компоненти като липополизахаридите (действайки чрез Toll-like receptor). Епидермалният растежен фактор има двоен ефект върху регулацията на генната експресия на NGAL, който е тъканно специфичен. В раковите клетки на панкреаса, лечението с рекомбинантен епидермален растежен фактор води до понижаване на иРНК и протеина. В бъбречните тубуларни клетки, третирането с епидермален растежен фактор води до значително повишение на иРНК и NGAL

п

р

о

т

е

и

н

ч

р

е

з

р

е

г

у

л

а

ц

и NGAL първоначално е изолиран от неутрофилите в комплекс с MMP-9, където той се синтезира в ранния миелоцитен стадий на гранулоцитопоеза, по време на образуване на вторичните гранули [186]. Пероксидазо-отрицателните гранули в човешки неутрофили включват континуум от гранули, съдържащи NGAL и MMP-9 в различно съотношение. Следователно, NGAL и MMP-9 са частично разделени, което може да обясни съществуването на не-асоциирани форми на двата протеина в неутрофилите. В зрелите неутрофили липсва иРНК и те не могат да синтезират NGAL. Екзоцитозата на NGAL от гранулите настъпва,

р

а

н

когато неутрофилите се активират във възпалително-инфекциозния фокус от възпалителни медиатори [114]. При здрави лица неутрофилите са основния източник на циркулиращия експресия на NGAL иРНК в костен мозък, трахея, млечна жлеза, бъбреци, черен дроб, бял дроб, тънки черва, слюнчени жлези, тимус, простата, адипоцити и макрофаги [51, 52]. Това е потвърдено и чрез имунохистохимичен анализ от Friedl A et al. (1999), доказващ наличие на NGAL протеин в същите тъкани [74]. Данните сочат, че NGAL се експресира главно в тъкани, които могат да бъдат изложени на микроорганизми или в жлези, които секретират към такива тъкани. Ограничените изследвания, проведени при човешки фетални тъкани, показват, че NGAL се експресира в трофобластните клетки на плацентата, хондроцити, епителни клетки в развиващия се бял дроб и тънки черва, епидермиса на феталната кожа [128].

2.4. NGAL – биологична роля

Основната биологична роля на NGAL е да действа като бактериостатичен агент срещу грам отрицателни микроорганизми, принадлежащи към рода *Enterobacteriaceae* и микобактерии. Тези бактерии синтезират специфични протеини, наречени сидерофори. Сидерофорите се свързват със свободното желязо и го транспортират в бактериите, където желязото се освобождава и задвижва бактериалната пролиферация. Сидерофорите имат няколко пъти по-висок афинитет към желязото в сравнение с ендогенните му хелатори [60, NGAL медира бактериостатичния си ефект, като свързва сидерофорите и ограничава доставката на желязо и желязо-медираните пътища в микробния агент. Експериментални доказателства за това дават Berger T. et al. (2006) с опит с генно модифицирани мишки с липсващ ген за NGAL, което ги прави по-податливи на инфекции и развитие на смърт от сепсис [28].

NGAL действа като хемоатрактант за неутрофили. Изследване върху миши модел на алогенна сърдечна трансплантация показва, че е налице значително намаление на неутрофилите, инфилтрирали трансплантираното сърце сред мишки с липсващ ген за Ngal, в сравнение с мишки с двете копия на гена [14].

Редица изследвания посочват ролята на NGAL в антиоксидантната защита. Roudkenar MN и човешкия ембрионален бъбрек води до повишение на ензимите супероксид дисмутаза и хемоксигеназа [162]. Повишена експресия на LCN-2 в урината се наблюдава и при асептични заболявания, изпълнявайки антиоксидантна функция. Образоването на комплекса NGAL-катехол-желязо, блокира реактивността на желязото и възпрепятства образуването на ROS. Свързвайки се със своя ендогенен лиганд, NGAL осигурява нетоксичното транспортиране и

рециклиране на желязо [26, 153].

NGAL участва и в желязо-медирани клетъчни отговори като пролиферация, диференциация и апоптоза. Биологичната роля на LCN-2 е свързана със забавяне на апоптозата и усилена пролиферация в отговор на патологични стимули. Този протективен ефект зависи от хелацията на токсично желязо от извънклетъчната среда и регулирания пренос на сидерофори и желязо към интрацелуларното пространство [167]. NGAL инхибира апоптозата и усилюва пролиферацията, предизвикана от исхемично-реперфузионно увреждане. Доказват ролята на Ngal в процесите на апоптоза и пролиферация на тубуларните епителни клетки. Те провеждат опит с мишки, предизвиквайки тубуларна исхемия чрез клампиране на бъбречния педикул за 30 мин. Оценяват апоптозата чрез имунофлуоресцентно оцветяване с маркировка dUTP, за оценка на пролиферацията използват моноклонално антитяло, което е специфично за пролифериращ клетъчен ядрен антиген. Установяват, че при мишките, третирани с Ngal, броят на клетките с апоптоза е значително по-малък, в сравнение с мишките, третирани със солеви разтвор, както и че броят на пролифериращите клетки е най-голям при мишките третирани 1 h преди исхемията с Ngal [132]. По време на формирането на бъбреците NGAL подпомага епителното диференциране на мезенхимните прогениторни клетки, което води до създаването на гломерули, проксимални тубули, бримка на Хенле и дистални тубули [167].

2.5. NGAL – механизъм на индукция и елиминация

Биологичните течности съдържат ниски нива на NGAL. В норма концентрацията на LCN-експресия от черния дроб и бъбреците [43, 153]. Той има кратък полуживот и бързо се изчиства от циркулацията ($t_{1/2} = 10-20$ min) посредством бъбречна екскреция. Axelsson L et al. първата констатират по-бърз клирънс на мономерната спрямо димерната форма ($t_{1/2} - 10$ min спрямо 20 min) и втора фаза, през която двете форми се изчистват с еднаква скорост [23]. и положителния заряд ($pI > 7.4$). Гломерулите филтрират около 3.4-4 mg NGAL на ден, но по-голяма част се реабсорбира в проксималния тубул, като загубата с урината е по-малка от 0.2%. Реабсорбцията се медира от мегалин/кубилин-зависима ендоцитоза в проксималните епителни клетки. След ендоцитоза LCN-2 се разгражда в лизозомите до фрагменти от 14 kDa тубула, като само 0.1 – 0.2% от инжектирания Ngal се открива в урината [135]. Урината

съдържа приблизително 20 ng/mL NGAL, произходът на този протеин е от плазмения, който заобикаля реабсорбцията в проксималните тубули, от неутрофилите в урината, от епитела на пикочния мехур и синтез от дисталния тубул. Чрез *in situ* хибридизация е доказана експресия на иРНК от бримката на Хенле и събирателните каналчета [61, 167]. Това означава, че повишената екскрецията на NGAL вероятно се дължи на бъбречна увреда със засягане на реабсорбцията му в проксималния тубул и/или индуциране на синтез *de novo* в дисталния тубул. По отношение на плазмения NGAL самият бъбрек не се явява основен източник, той произхожда и от други органи – черен дроб, бял дроб, активирани неутрофили, макрофаги и други клетки на имунната система. Освен това всяко намаление на гломерулната филтрация намалява екскрецията на NGAL с последващо повишение в системното кръвообращение [9].

2.6. NGAL – референтни граници

Към момента няма налични международни препоръки или насоки при анализа на NGAL, което води до редица ограничения при лабораторната му оценка. С оглед липсата на стандартизация, референтните граници на pNGAL и uNGAL са в зависимост от използвания метод, платформа, подбора и разпределението на референтната група [47, 98].

Концентрацията на NGAL е по-висока в серум спрямо плазма, което се дължи на дегранулация на неутрофилите по време на съсирването. Когато се измерва нивото на циркулиращия NGAL, подходящ материал за анализ е плазмата, тъй като в серума могат да се отчетат фалшиво по-високи резултати [98]. Сравнителен анализ между нивата на NGAL в EDTA и хепаринова плазма отчита по-високи стойности при използване на антикоагуланта литиев хепарин, авторите препоръчват използване на идентичен биологичен материал при сравнение на резултатите [87].

измерват нивата на NGAL в серум, чрез усилен с частици имунотурбидиметричен анализ (PETIA), сред 454 здрави доброволци, на възраст между 21 – 75 години. Те посочват като горна граница на референтния интервал 122.57 µg/L, въз основа на 95-ия персентил. Авторите констатират сигнификантна разлика в стойностите на NGAL във възрастовата група 21 – 44 г. спрямо 45 – 75 г. и извеждат като горна граница на референтния интервал в групата под 44 години < 116.52 µg/L, и в групата над 45 години < 126.9 µg/L [207]. Makris K et al. (2015) определят концентрацията на NGAL в EDTA плазма сред 200 здрави лица на възраст 18 – 65 г., чрез PETIA. Те докладват полово зависими референтни граници за pNGAL, съответстващи на 5-ия и 95-ия персентил: при мъже – 38.7 – 157.6 ng/mL, и при жени – 24.4 – 142.5 ng/mL. Установена е слаба, но значима корелация между pNGAL и възрастта ($\rho = 0.177$, $p = 0.01$) има изходни стойности на pNGAL 82.49 ± 18.82 ng/mL, оценена в EDTA плазма чрез PETIA

, измерват нивата на NGAL в EDTA плазма сред 142 здрави деца на възраст 0 – 15г., чрез персентил, при деца – 1.4 – 78.6 µg/L, не се установява сигнификантна разлика между отделните възрастови групи [195].

Прегледът на данните в литературата показва, че референтни стойности за uNGAL зависят от използвания биологичен материал за анализ, аналитичен метод, платформа, начин на представяне на резултатите: като абсолютни стойности или съотношение uNGAL/uCreatinine, използваните мерни единици. Към момента няма ясни насоки дали нормализирането чрез съотношението UNC подобрява диагностичната надеждност на NGAL като тубуларен биомаркер. Delanaye P et al. (2011) оценяват биологичната интраиндивидуална вариация на и UNC в проби от първа сутрешна и случайна порция урина и констатира наличието на значима разлика в стойностите на uNGAL (CV – 94%, 132%). Те препоръчват използването на съотношението UNC, с цел избягване на дневната вариация в стойностите на uNGAL, поради разлика в осмоларитета на урината. Авторите акцентират върху предимствата на UNC в сравнение с абсолютните стойности на uNGAL в условия на спешност, когато се използва случайна порция урина [58]. Makris K et al. (2015) отбелязват, че при използване на съотношението UNC трябва да се вземат в предвид и детерминанти, повлияващи екскрецията на креатинина [127]. При динамични състояния като ОБУ и бъбречна трансплантация скоростта на екскреция на креатинина се променя с течение на времето и не винаги следва тази на NGAL [127, 178].

определят концентрацията на uNGAL в случайна порция урина сред 200 здрави лица на възраст 18 – 65 г. чрез PETIA и посочват като горна граница на референтния интервал – 54.5 125 здрави доброволци на възраст 22 – 77 години и установяват референтни граници: при жени < 65 ng/mL, и при мъже < 23.4 ng/mL [166]. В изследването на Ж. Христова-Димитрова и сътр. (2015) изведените полово зависими референтни стойности за uNGAL, чрез ELISA метод са: при жени – 0.16 – 73.04 ng/mL, и при мъже – 5.54 – 23.86 ng/mL [10]. Bennett MR et на възраст 3 – 18 години, чрез ELISA и определят като горна референтна граница на uNGAL при деца – 57.6 ng/mL (момичета < 73.1 ng/mL, и момчета < 28.3 ng/mL). Проучването докладва полово зависими стойности за отделните възрастови групи [27]. Rybi-Szumińska et съобщават референтни граници за UNC както следва: 0.2 – 5.9 г. – 33.91 ng/mg; 6 – 9.9 г. – стойностите на UNC в урината са по-високи при деца на възраст под 6 години и намаляват с

възрастта [164]. Askenazi DJ et al. (2011) наблюдават намаление на нивата на uNGAL с увеличаване на гестационната възраст при недоносени бебета. Те установяват приблизително 4-кратно намаление на uNGAL и 6-кратно намаление UNC от ≤ 26 до 36 гестационна седмица. Освен това нивата на NGAL в урината при новородени показват значителна положителна корелация с женския пол, но не и с расата [20]. По-високите стойности на NGAL в урината при недоносени деца може да са резултат от неспособността на незрелите тубули да реабсорбират протеина. NGAL играе и важна роля в развитието на бъбреците, тъй като той е фактор на растеж и диференциация в множество клетъчни типове, включително и в бъбреците

Повишена концентрация на pNGAL и uNGAL се наблюдава при редица доброкачествени заболявания като инфекциозни, метаболитни, исхемични, бъбречни, при употреба на лекарства и интоксикация и при злокачествени заболявания [43].

3. Роля на NGAL в диагностиката на ХБЗ

Съществуват много малко валидирани биомаркери за мониториране на пациентите с хронични бъбречни заболявания. NGAL е структурен тубуларен маркер, чиято експресия се повишава преди намалението на бъбречната функция. Увеличените стойности на pNGAL и uNGAL могат да индикират степента на субклинична тубуларна увреда, настъпваща преди загубата на бъбречна функция и да бъдат по-ранни маркери за настъпването на бъбречна дисфункция от класическите гломерулни показатели – eGFR и AER/ACR [62, 215]. Нарастващите литературни данни сочат, че NGAL е полезен маркер за оценка на тежестта и клиничния изход при пациентите с ХБЗ. Независимо от етиологията на ХБЗ, тубулоинтерстициалните лезии са краен път в еволюцията на заболяването и тяхната тежест диктува отговора към лечението и прогнозата за прогресия до ТБН. Проспективно проучване при 45 деца с II – IV стадий на ХБЗ показва, че плазмените концентрации на NGAL са в обратна корелационна зависимост с GFR ($p < 0.001$). При пациентите с $eGFR < 30$ mL Проучване на Bhavsar NA et al. (2012), проследява 143 здрави контроли и 143 пациенти с ХБЗ, с $eGFR \geq 60$ mL/min/1.73 m² и $ACR \leq 30$ mg/g, в рамките на 9 г. и установява, че пациентите с концентрация на uNGAL в четвърти квартил имат 2 пъти по-висок риск от прогресия до III стадий на ХБЗ, в сравнение с тези в първи квартил. По-високата изходна концентрация на проучване, което оценява влошаването на бъбречната функция в рамките на 5 години и 10-годишния риск от хоспитализация при 1 245 жени, на възраст > 70 г. от общата популация, установява, че лицата с концентрация на pNGAL над средните стойности за групата, имат 1.7

пъти по-висок риск от бърз спад в eGFR. В кохортата с eGFR < 60 mL/min/1.73m², включването на pNGAL значително подобрява точността в моделите за прогнозиране на 10-годишния риск от хоспитализация, свързана с бъбречни заболявания и/или смъртност (AUC ROC без и с NGAL – 0.64 и 0.71, p = 0,027) [120]. Тези резултати показват, че pNGAL и uNGAL са полезни прогностични маркери при пациенти с ХБЗ. Въпреки това, поради различната етиология на ХБЗ е необходимо да се оцени ролята на NGAL като биомаркер за бъбречно увреждане в отделните нозологични единици. Детайлни проучвания са проведени при пациенти с кардио-ренален синдром, глумерулонефрит, IgA-нефропатия, лупусен нефрит, бъбречна поликистоза, нефросклероза, обструктивна нефропатия, ДБЗ и др. [43, 98, 145].

4. Роля на NGAL в диагностиката на ДБЗ

Развитието на ДБЗ при пациентите със ЗД се асоциира с повишен риск от ССЗ и смъртност. ДБЗ е водеща причина за развитието на ТБН, налагаща необходимост от хемодиализа и/или бъбречна трансплантация [159]. Скорошни проучвания показват, че не само гломерулни, но и тубулоинтерстициални увреждания са важен фактор в патофизиологията и прогресията на ДБЗ [181]. Според хипотезата за „тубуларна фаза“ на ДБЗ, тубуларното увреждане е първично нарушение, инициращо развитието на бъбречна дисфункция при пациентите със ЗД [107, при пациентите със ЗД, корелират по-добре със степента на тубулоинтерстициалните промени в сравнение с тежестта на гломерулосклерозата [131]. Fioretto P et al. (1996) съобщават, че само 29% от пациентите със ЗД с повишена скорост на албуминова екскреция имат типичните хистологични гломерулни увреждания, от друга страна 42% са с тежки тубулоинтерстициални лезии [70]. Въз основа на тези констатации са проведени редица проучвания, за да се оцени ролята на тубуларните биомаркери в диагностиката на ДБЗ. Тубуларни маркери, докладвани като предиктори на ДБЗ, са цистатин С, молекула за бъбречно увреждане-1 (KIM-1 – Kidney Injury Molecule-1), α 1-микроглобулин, N-ацетил- β -D-

Г

л

ю

к

о През последните 15 години е съсредоточен значителен изследователски интерес върху ролята на NGAL като маркер за ДБЗ. Проучванията показват статистически значима корелация между стойностите на NGAL и лабораторните маркери за диагноза, класификация, м прогноза на ДБЗ, и с маркерите за гликемичен и метаболитен контрол на ЗД. NGAL е и определян като ранен показател за ДБЗ, който оценява и риска от прогресия на заболяването до ТБН [16, 33, 86, 116, 126, 165, 220, 221].

и

д

а

з

4.1. Роля на NGAL в патофизиологията на ДБЗ

Въпреки големият брой проучвания, демонстриращи клиничната приложимост на NGAL в диагностиката на ДБЗ, към момента има малко литературни данни за ролята на LCN-2 в патофизиологията на бъбречното увреждане при ЗД. Liu X et al. (2021) демонстрират реналния протективен ефект на NGAL срещу хипергликемията, чрез намаление на ROS, възпалението и фиброзата. Резултатите от проучването показват, че нарушената експресия на NGAL в култивирани проксимални бъбречни епителни (НК-2) клетки значимо повишава оксидативния стрес, предизвикан от хипергликемията. Липсващият ген за Ngal при мишки със ЗД води до по-високи нива малоналдеhid, по-ниска концентрация на глутатион и намалена активност на супероксид дисмутаза и каталаза в бъбречните тъкани. „Knockdown“ на NGAL гена в НК-2 повишава секреция на интерлевкин-6, трансформиращ растежен фактор- β , фибронектин и колаген IV. Интерлевкин-6 инициира хроничното възпаление и неговата експресия се счита за важен медиатор на бъбречното увреждане при ЗД. В състояние на хипергликемия, трансформиращ растежен фактор- β стимулира производството на екстрацелуларни матриксни протеини и има ключова роля в развитието на гломерулосклерозата и тубулоинтерстициалната фиброза при ДН. Мишките със ЗД с „knockout“ на гена за Ngal показват по-бързо влошаване на бъбречната функция и по-изявени патохистохимични белези на ДН, в сравнение с мишките с двете копия на гена [123]. В контраст с протективната роля на NGAL, други проучвания определят LCN-2 като основен медиатор на бъбречното увреждане при ХБЗ. NGAL се счита за провъзпалителен фактор, който стимулира прогресията на бъбречното заболяване при ЗД [37]. Viau A et al. (2010) демонстрират, че при мишки с ХБЗ инактивирането на гена за Ngal намалява тежестта на бъбречните лезии. Дефицитът на Lcn-2 при мишки със субтотална нефректомия, ограничава развитието на гломерулосклерозата, тубуларната атрофия и интерстициалната фиброза. Авторите посочват, че активиране на рецептора за епидермален растежен фактор повишава експресията на Lcn-2 и установяват при плъхове със стрептозотоцин индуциран диабет сигнификантно по-високи нива на маркери за оксидативен стрес в сравнение с контроли. Те констатирали значимо по-висока тубуларна експресия на Ngal и концентрация на uNgal при плъховете с диабет и демонстрират, че лечението с антиоксиданти води до понижението им. Концентрацията на pNgal не показва сигнификантна разлика между изследваните групи [79]. Romi MM et al. корелира с давността на ЗД. Те установяват значимо по-висока експресия на мегалин, кубилин и Ngal от епителните клетки на бъбречните каналчета при плъховете със ЗД в сравнение с контроли и обобщават, че повишената им експресия може да е проява на тубуларно увреждане

и апоптозата характерни за ДН [161]. Hwang S et al. (2017) изследват връзката между тъканната експресия на NGAL и KIM-1, както и хистопатологични и лабораторни параметри за бъбречната прогресия при пациенти с доказана ДН. Проучването установява, че IFTA-score положително корелира със спад на eGFR и констатира, че тубулоинтерстициалното увреждане е най-важната хистологична находка в прогресията на ДН. Тъканната експресия на NGAL и KIM-1 корелира отрицателно с eGFR, но само тъканната експресия на NGAL е независим предиктор за спад на eGFR [100].

4.2. NGAL като маркер за ДБЗ

Първите данни за ролята на NGAL като маркер за ДБЗ са докладвани от Volignano D et al. здрави контроли. Резултатите показват сигнификантно по-високи концентрации на pNGAL и uNGAL при пациентите със ЗД в сравнение с контроли, статистически значима разлика в стойностите на pNGAL и uNGAL между групите със ЗД без албуминурия и контролната група, позитивна корелация между pNGAL и uNGAL с албуминурията и негативна корелация с GFR [33]. Последващите резултати потвърждават клиничната приложимост на NGAL в диагностиката на бъбречното увреждане сред пациенти със ЗД. Стойностите на NGAL корелират с прогресията на албуминовата екскреция, със спад на GFR и с тежестта на ДБЗ, както при пациенти със ЗД I, така и при пациенти със ЗД II (Табл.4 и Табл.5) [18, 22, 86, 116, възрастни със ЗД I. Те установяват, че средните стойности на pNGAL в двете пациентски кохорти – деца и възрастни, се различават сигнификантно както помежду си (67.6 vs 85.2 ng/mL), така и със съответните им контролни групи (67.6 vs 24.6 ng/mL и 85.2 vs 76.1 отрицателна корелация с eGFR ($p < 0.001$) [152]. Hafez MH et al. (2015) проучват ролята на uNGAL в диагностиката на ДБЗ при деца със ЗД I и посочват значимо по-високи резултати при пациенти с патологична албуминурия спрямо тези с нормална албуминурия и спрямо контролната група (39.14 vs 15.69, 5.66 ng/mL), установена е сигнификантна корелация между стойностите на uNGAL и ACR ($p = 0.001$), но не и с eGFR [86]. Mahfouz MH et al. (2016) докладват по-високи резултати на pNGAL при пациентите със ЗД II с умерено и силно повишен ACR спрямо референтната група (97.8, 131 vs 46.5 ng/mL). Те демонстрират връзката на pNGAL с прогресията на ДБЗ, като посочват положителна корелация на показателя с ACR ($r=0.582$, $p=0.0001$) и отрицателна с GFR ($r=-0.415$, $p=0.0001$) [126]. Žyčka A et al. (2018) изследват ролята на гломерулни и тубуларни маркери в диагностиката на ДБЗ при пациенти със ЗД II и обобщават, че NGAL е полезен маркер в диагностиката на ДБЗ. Авторите

констатира значима корелация между ACR с uNGAL ($p < 0.001$) и с UNC ($p = 0.002$), както и сигнификантно по-високи концентрации на pNGAL, uNGAL и UNC в групата с ACR > 30 mg/g в сравнение с кохортата с ACR < 30 mg/g (67.2 vs 53.8, 24.7 vs 10.3 $\mu\text{g/L}$, 35.1 vs 9.02 $\mu\text{g/g}$)

Определените cut-off стойности в различните проучвания демонстрират добра до отлична диагностична ефективност на NGAL при идентифициране на пациенти с ДБЗ сред пациентите със ЗД (Табл.6 и Табл.7) [86, 126, 138, 221]. Hafez MH et al. (2015) констатира, че cut-off стойност на uNGAL – 11.75 ng/mL, установява наличието на ДБЗ при пациенти със ЗД I, с чувствителност 82% и специфичност 67% [86]. Mahfouz MH et al. (2016) посочват, че стойност на pNGAL – 91.5 ng/mL, отдиференцира пациентите с повишена албуминурия при ЗД II, с AUC-ROC-0.881 [126]. Žyčka A et al. (2018) описват следните cut-off стойности на NGAL в детекцията на повишена албуминова екскреция при пациентите със ЗД II: pNGAL – 61 $\mu\text{g/L}$ с AUC-ROC - 0.69, uNGAL – 14.3 $\mu\text{g/L}$ с AUC-ROC - 0.74 и UNC - 28.3 $\mu\text{g/g}$ с AUC-ROC – 0.71) [221]. Мета анализ, оценяващ ролята на pNGAL в диагностиката на ДБЗ, установява обединена чувствителност и специфичност – 79% и 87%, обединено отношение на положителна (PLR) и отрицателна вероятност (NLR) – 5.97 и 0.24. Анализът демонстрира, че pNGAL е подходящ маркер за потвърждаване на ДБЗ, но има ограничена роля в отхвърляне на диагнозата [91]. Tang XY et al. (2019) обобщават данните за ролята на uNGAL в диагностиката на ДБЗ и посочват AUC-ROC-0.88 и PLR-4.3 в проучванията с напречно и AUC-ROC-0.98 и PLR-14.0 в кохортните проучвания. Авторите констатира, че натрупаните доказателства показват ефикасността на uNGAL като маркер за бъбречно увреждане сред пациентите със ЗД [179].

Таблица 4. Проучвания оценяващи ролята на NGAL в диагностиката на ДБЗ при ЗД I

Проучване	ТГ/КГ (брой)	Възраст ТГ/КГ	Показател	Единици	ТГ/ КГ - NGAL		
[A1/КГ					Не	Не
[A1/КГ					Да	Не
[A1/КГ					Да	Не
[A2-A1/КГ					Не	Да
[A2-A1/КГ					Не	Да
[A2:A1/КГ					Да	Не
[A1/КГ					Не	Не
[A3:A2:A1/КГ					Да	

							(A3)
--	--	--	--	--	--	--	------

Таблица 5. Проучвания оценяващи ролята на NGAL в диагностиката на ДБЗ при ЗД II

Проучване	ТГ/КГ (брой)	Възраст ТГ/КГ	Показател	Единици	ТГ/ КГ - NGAL		
[A3:A2:A1/КГ					Не	Да
						Да	Да
[A3:A2:A1/КГ					Да	Да
[A2:A1/КГ					Не	Не
[A3:A2:A1/КГ					Да	
[A2:A1					Да	
Žyřka A,	A2:A1			$\mu\text{g/L}$		Не	Не
]				$\mu\text{g/L}$		Да	Не
				$\mu\text{g/g}$		Да	Не
[A3:A2:A1/КГ					Да	
[A3:A2:A1/КГ					Не	
[A3:A2:A1/КГ						Да
[A3:A2:A1/КГ					Да	Да
[A2:A1/КГ					Да	
[A3:A2:A1/КГ			$\mu\text{g/g}$		Да	Да
[A3:A2:A1/КГ					Да	Да
						Да	Да
[A3:A2:A1/КГ					Да	Да
[Да	Не

липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$), ²липсва сигнификантна разлика между A2 и A1 ($p > 0.05$), ³ липсва сигнификантна разлика между A3 и A2 ($p > 0.05$)

Съкращения: ТГ– таргетна група; КГ– контролна група; A1-пациенти със ЗД с нормална AER/ACR; A2- пациенти със ЗД с умерено повишена AER/ACR; A3- пациенти със ЗД със силно повишена AER/ACR; +ACR – установена сигнификантна положителна корелация с AER/ACR ($p < 0.05$); -GFR - установена сигнификантна отрицателна корелация с GFR ($p < 0.05$).

Таблица 6. Диагностична ефективност на pNGAL в диагностиката на ДБЗ

контроли vs ЗД с умерено повишена AER

Проучване	ИП	ФО	ИО	ФП	Чувствителност	Специфичност
[-0.93)	-0.85)
Žyřka A, 2018 ^[221, 91]					(0.54–0.94)	0.61 (0.47–0.73)
[0.92 (0.81–0.97)	0.92 (0.78–0.98)
[0.96 (0.80–1.00)	0.80 (0.59–0.93)
[0.64 (0.54–0.74)	0.89 (0.81–0.95)

Таблица 7. Диагностична ефективност на uNGAL в диагностиката на ДБЗ

контроли vs ЗД с умерено повишена AER

Проучване		ИП	ФО	ИО	ФП	Чувствителност	Специфичност
[
Zyflka A, 2018 ^[221, 91]	µg/L					0.79 (0.54–0.94)	0.61 (0.47–0.73)
[0.90 (0.79–0.96)	0.83 (0.67–0.94)
[(0.46–0.85)	(0.68–0.99)
[

проучвания, проведени при пациенти със ЗД I; ² проучвания, проведени при пациенти със ЗД II.

Съкращения: ИП – истинско положителни; ФО – фалшиво отрицателни; ИО – истинско отрицателни;

ФП – фалшиво положителни.

4.3. NGAL като ранен маркер за ДБЗ

Според хипотезата за „тубуларна фаза“ на ДБЗ тубулното увреждане е първично нарушение инициращо развитието на бъбречна дисфункция при пациентите със ЗД, следователно структурен тубуларен маркер като NGAL може да бъде по-ранен лабораторен признак за ДБЗ от AER [107, 116]. Литературните данни демонстрират значимо по-висока концентрация на NGAL в плазма и урина при пациенти със ЗД с нормална скорост на албуминова екскреция в сравнение с контролна група [11, 22, 33, 69, 76, 116, 144, 177, 190, стойности на pNGAL и uNGAL при пациенти със ЗД I с нормална AER спрямо контроли диабетици не изключва наличието на ДБЗ и посочват pNGAL като по-чувствителен маркер от AER за оценка на бъбречната функция при деца със ЗД [215]. Lacquaniti A et al. (2013) описват сигнификантна разлика в средните стойности на pNGAL и uNGAL между пациенти със ЗД I с нормална AER спрямо референтната група както следва: pNGAL – 193.7 vs 46.4 ng/mL ($p < 0.001$), uNGAL – 25.5 vs 6.5 ng/mL ($p < 0.001$). Авторите определят NGAL като ранен биомаркер за бъбречно увреждане при ЗД, който има отлична диагностична ефективност в идентифициране на пациенти с ДБЗ сред лицата с нормална AER, cut-off на pNGAL – 77.4 значима разлика в стойностите на изследваните показатели, както между отделните стадии на ДБЗ, така и между пациентите със ЗД с нормален ACR и контроли. Те определят следните cut-off стойности в идентифицирането на ДБЗ с нормален ACR – pNGAL – 78.73 ng/mL с AUC- Авторите описват NGAL като маркер за тубулоинтерстициално увреждане, който може да установи развитието на ДБЗ, преди неговото диагностициране с повишената AER и определят pNGAL и uNGAL като полезни и неинвазивни показатели за диагностика, стадиране и оценка на прогресията на ДБЗ [107]. Abbasi F et al. (2020) установяват значимо по-високи концентрации на NGAL в урината при пациенти със ЗД II с ACR < 30 mg/g в сравнение с

контроли (114.1 vs 77.0 ng/mg, $p < 0.05$) и резюмират, че uNGAL е тубуларен маркер, който се увеличава преди констатирането на бъбречно увреждане чрез гломерулните показатели и използването му в комбинация с ACR и eGFR може да повиши ефективността в ранната диагностика на ДБЗ [11]. ROC анализи, извършени в други проучвания, установяват добра до висока ефективност на pNGAL и uNGAL в разграничаване на пациентите с ДБЗ с нормална AER от здрави лица (Табл.8 и Табл.9) [11, 107, 116, 215]. Мета-анализ на He P et al. (2020) определя NGAL като маркер за ранна диагностика на ДБЗ и полезен диагностичен показател за отдиференциране на отделните стадии на бъбречното увреждане при ЗД. Авторите констатират, че NGAL се доближава до идеалния тубуларен маркер за ДБЗ, който корелира положително с ACR, демонстрира отрицателна корелация с eGFR и присъства при пациенти с ACR <30 mg/g [91].

Таблица 8. Диагностична ефективност на pNGAL в отдиференцирането на пациенти със ЗД с нормална AER от контроли. pNGAL: контроли vs ЗД с нормоалбуминурия

Проучване	ИП	ФО	ИО	ФП	Чувствителност	Специфичност
[0.94 (0.70–0.99)	1.00 (0.81–1.00)
[1.00 (0.98–1.00)	(0.98–1.00)
[0.88 (0.76–0.96)	1.00 (0.90–1.00)
[
[0.91 (0.81–0.97)	0.84 (0.70–0.93)
[0.36 (0.81–0.97)	0.84 (0.70–0.93)
[
[

проучвания, проведени при пациенти със ЗД I; ² проучвания, проведени при пациенти със ЗД II.
 Съкращения: ИП – истинско положителни; ФО – фалшиво отрицателни; ИО – истинско отрицателни;
 ФП – фалшиво положителни

Таблица 9. Диагностична ефективност на uNGAL в отдиференцирането на пациенти със ЗД с нормална AER от контроли. uNGAL: контроли vs ЗД с нормоалбуминурия

Проучване	ИП	ФО	ИО	ФП	Чувствителност	Специфичност
[0.75 (0.48–0.93)	1.00 (0.81–1.00)
[
[
[0.99 (0.95–1.00)	0.95 (0.85–0.99)
[0.84 (0.73–0.92)	0.86 (0.65–0.97)

проучвания, проведени при пациенти със ЗД I; ² проучвания, проведени при пациенти със ЗД II.
 Съкращения: ИП – истинско положителни; ФО – фалшиво отрицателни; ИО – истинско отрицателни;
 ФП – фалшиво положителни

4.4. NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ

Редица проучвания посочват предиктивната роля на тубулоинтерстициалните лезии в прогресията на ДН [95, 148]. Mise K et al. (2015) доказват значението на IFTA-score в оценка на риска от прогресия на бъбречните усложнения при пациенти със ЗД [131]. Това определя ролята на тубуларни маркери като NGAL като детерминанти за ранен спад на бъбречната функция при пациенти със ЗД. Satirapoj B et al. (2016) установяват, че пациентите със ЗД II с по-високи нива на uNGAL имат по-бърз спад в бъбречната функция, $UNC > 772 \text{ ng/g}$ прогнозира спад на $eGFR > 25\%$ годишно, с AUC-ROC – 0.64. Използвайки мултивариационен регресионен анализ, авторите констатираат, че честотата на пациентите с бърза бъбречна прогресия е по-висока в горните квартали на UNC, отколкото в долните квартали. Те подчертават решаващата роля, която играе тубуларното увреждане в прогресията на ХБЗ и развитието му до терминален стадий [165]. Nowak N et al. (2018) оценяват изходните нива на гломерулни и тубуларни маркери, свързани с ранен спад на бъбречната функция, проследявайки голяма кохорта пациенти със ЗД II с нормален eGFR за период от 5 – 12 г. Те констатираат че UNC е сигнификантно по-висок в групата с бърз спад на бъбречната функция, дефинирана като понижение на $eGFR > 30\%$ за период от 5 години, в сравнение с пациентите с по-нисък спад на eGFR [147]. Phanish MK et al. определят диагностичната стойност на показатели за тубуларно увреждане, възпаление и фиброза в прогресията на ДБЗ. Авторите установяват, че при пациенти с нормална скорост на албуминова екскреция, нито един биомаркер самостоятелно не може да предскаже развитието на бъбречната дисфункция при ЗД, но възпалителните цитокини интерлевкин-6 и моноцитен хемоатрактант протеин-1 в комбинация с NGAL демонстрират AUC-ROC от 79% [156]. Проспективно кохортно проучване установява, че пациентите със ЗД, с по-високи нива на възпалителния хемокин CXCL12, NT-proBNP и uNGAL имат два пъти по-висок риск от прогресия на бъбречното увреждане, оценен като рязък спад или намаление с $> 50\%$ на eGFR, или започване на бъбречна заместителна терапия. Авторите посочват необходимостта от допълнителни проучвания за да се изяснят патогенетичните пътища, водещи до развитие на бъбречна дисфункция, както и потенциалната роля на тези маркери в стратификация на риска от прогресия на ХБЗ [18].

NGAL като маркер за оценка на сърдечно-съдовия риск при ДБЗ

Развитието на ДБЗ при пациенти със ЗД повишава риска от сърдечно-съдови инциденти. Ето защо няколко проучвания оценяват предиктивната стойност на NGAL като маркер за сърдечно-съдовия риск при пациенти с ДБЗ. Papadopoulou-Marketou N et al. (2017) установяват положителна корелация между pNGAL и систолното артериално налягане при пациенти със ЗД I. Те посочват, че умерено повишение на артериалното налягане при

пациенти с ЗД I се наблюдава в субклиничната фаза на ДБЗ, 5 години преди появата на повишен ACR, като корелацията на NGAL със систолното артериално налягане може да отразява ранните асимптоматични етапи на бъбречното увреждане. Проучването очертава ролята на NGAL като прогностичен маркер за сърдечно-съдова заболяемост при пациенти със ДБЗ [152]. Żyłka A et al. (2016) анализират ролята на uNGAL в оценка на риска от сърдечно-съдови заболявания при пациенти със ЗД II. Логистичният регресионен анализ показва, че uACR > 30 mg/g и uNCR >21.3 µg/g са предиктори на сърдечно-съдови усложнения, независимо от класическите рискови фактори и продължителността на диабета. Една година след стартиране на нефропротективна терапия се наблюдава значително намаление на HbA1c, uNGAL и uNCR. Авторите обобщават, че наблюдаваната тенденция за понижение в стойностите на uNGAL и uNCR показва положителното влияние на многофакторното лечение, насочено към ограничение прогресията на тубуларното увреждане

4.6. NGAL – връзка с гликемичния контрол и развитието на ДБЗ

Diabetes Control and Complications Trial Research Group посочват, че дългосрочната кумулативна гликемична експозиция е основен рисков фактор за развитието на ДБЗ, високите нива на триглицеридите и систолно кръвно налягане са също независими детерминанти за бъбречно увреждане при пациенти със ЗД [155]. В съответствие с тези данни проучвания оценяват връзката между лошия контрол на ЗД и развитието на ДБЗ, с нивата на pNGAL и uNGAL. Lacquaniti A et al. (2013), установяват в проучване сред пациенти със ЗД I, статистически значима връзка между pNGAL и гликемичния контрол оценен чрез HbA1c. Те акцентират върху ролята на продължителната хипергликемия в развитието на микроваскуларните усложнения при ЗД [116]. Hafez MH et al. (2015) докладват значима положителна корелация между uNGAL и продължителността на диабета, HbA1c и дислипидемията. Те обобщават, че uNGAL може да бъде полезен ранен биомаркер за ДБЗ при пациенти с неконтролиран и дългогодишен ЗД I [86]. Al-Refai et al. (2014) определят uNGAL като показател за бъбречно увреждане при пациенти със ЗД тип II и установяват положителна корелация между logUNC и HbA1c, регресионният анализ посочва HbA1c като независим предиктор на съотношението logUNC [16]. Mahfouz MH et al. (2016) констатират сигнификантна корелация между плазмените нива на NGAL с давност на диабета, систолно и диастолно кръвно налягане, HbA1c, HOMA-IR и триглицериди при пациенти със ЗД II. Те посочват лошия гликемичен контрол, като основен фактор в развитието и прогресията на ДБЗ и определят pNGAL като ранен маркер за тубулно увреждане при пациенти със ЗД [126].

4.7. NGAL като маркер за диференциране на ДБЗ от НДБЗ

Към момента няма стандартизирани критерии за извършване на бъбречна биопсия при пациенти със ЗД. Тя се прилага при пациенти със ЗД, при които се предполага наличие на нефропатия, различна от ДН. През последното десетилетие се установи, че ДН не е единственото бъбречно увреждане при диабетиците, като зачестяват проучванията за значителна честота на недиабетни бъбречни заболявания (НДБЗ) сред тях. Проучвания, оценяващи хистологични находки при бъбречни биопсии, проведени при пациенти с диабет показват, че честотата на НДБЗ сред пациентите със ЗД е от 3% до 82.9% [97]. Различните критерии за подбор могат да обяснят тази вариабилност. Най-често срещаните патоморфологични находки извън ДН, при пациентите със ЗД са мембранозен гломерулонефрит, IgA-нефропатия, лупусен нефрит, фокална сегментна гломерулосклероза, хроничен тубулоинтерстициален нефрит и др. [3, 176]. Duan S et al. (2020) посочват потенциалната роля на uNGAL при идентифициране на ДН от НДБЗ при пациенти със ЗД. Проучването обхваща 100 пациенти със ЗД II с бъбречни усложнения, които са категоризирани в 2 групи спрямо хистологичните находки, като потвърдена с биопсия ДН и НДБЗ. Резултатите показват значително по-високи нива на uNCR при пациенти с ДН в сравнение с тези с НДБЗ (28.65 vs 27.47 ng/mg, $p < 0.001$). Оптималната cut-off стойност на uNCR за отдиференциране на ДН е 60.685 ng/mg, стойност показваща висока специфичност (5%), но относително ниска чувствителност (55.7%). uNCR корелира сигнификантно с оценка на интерстициалното възпаление и глобалната склероза. Пациентите с uNCR > 60.685 ng/mg имат 7.595 пъти по-висока вероятност за масивна протеинурия и сигнификантно по-висок риск от развитие на ТБН ($p = 0.048$) в сравнение с групата с uNCR ≤ 60.685 ng/mg. Авторите обобщават, че uNCR може да служи като полезен маркер в диференциалната диагноза на бъбречното увреждане при пациенти със ЗД и като показател, разграничаващ пациентите, нуждаещи се от потвърждаваща биопсия [65].

5. Ограничения на NGAL като маркер в диагностиката на ДБЗ

5.1. Недостатъци на NGAL като диагностичен маркер за ДБЗ

В контраст с тези обещаващи данни за ролята на NGAL в диагностиката ДБЗ, редица проучвания представят незадоволителни диагностични характеристики на маркерът при ДБЗ със ЗД I с нормален и повишен ACR и обобщават, че концентрацията на pNGAL не винаги се повишава при пациенти със ЗД и при развитието на ДБЗ [59]. Sisman P et al. (2020) не установяват корелация между uNGAL с екскрецията на албумин в урината при пациенти със ЗД I и посочват, че uNGAL не трябва да се използва като алтернатива на AER/ACR в

диагностика на ДБЗ [174]. Sharif E et al. (2019) не констатират разлика в средните стойности на uNGAL между здрави лица и пациенти със ЗД II, независимо от гликемичния контрол. Те обобщават, че концентрациите на uNGAL не корелират с нито един от показателите, оценяващи бъбречна функция и не може да се използва като ранен маркер за ДБЗ [170]. Бъбречното увреждане при пациенти със ЗД II. Те установяват сравними средни стойности на pNGAL и uNGAL между групите с нормална и умерено повишена скорост на албуминова екскреция, липсата на значима корелация между NGAL с ACR, eGFR и показатели, оценяващи контрола на ЗД. Авторите обясняват наблюдаваните резултати с констатацията, че ЗД е хипергликемично и провъзпалително състояние, което води до повишено производство на NGAL от екстраренални тъкани [21]. Редица причини извън ДБЗ могат да индуцират експресията на NGAL, в частност ЗД, сърдечно-съдовите заболявания, инфекциите на пикочните пътища и др. [21, 125, 137, 208].

5.2. Причини извън ДБЗ, водещи до повишена експресия на NGAL

5.2.1. NGAL като маркер за инсулинова резистентност и ЗД

Последните проучвания при хора и животни показват, че и липокалин-2 е модулатор на инсулиновата сигнализация и неговите нива са повишени при лица със затлъстяване, инсулинова резистентност и при пациенти със ЗД. LCN-2 е определян като адипокин с проинфламаторни функции, тясно свързан с метаболитния синдром. Повишените нива на pNGAL показват положителна корелация с Body mass index (BMI), обиколката на талията, хипертриглицеридемията, хипергликемията и инсулиновата резистентност и са в обратна корелация с HDL-холестерол [12]. Yan QW et al. (2007) установяват, че експресията на Ngal в мастната тъкан на мишки е повишена при затлъстяване и Lcn-2 действа като адипоцитен медиатор на инсулиновата резистентност. Агенти, които стимулират инсулиновата резистентност, като глюкокортикостероиди и tumor necrosis factor- α (TNF- α), индуцират експресията на Ngal. Хипергликемията повишава, а тиазолидиндионите намаляват експресията на Lcn-2 в адипоцитите [211]. Подобни резултати са получени от проучвания при бременни жени с гестационен диабет, които са имали значително по-високи нива на циркулиращия NGAL, отколкото тези без това усложнение на бременността. Плазмените нива на LCN-2 при бременни жени корелират положително с BMI преди бременността, с измерената глюкоза и инсулин на гладно, общ холестерол, триглицериди и НОМА-IR в групата с гестационен диабет [124].

откриват при мишки, синтез и секреция на Ngal от остеобластите. Техните проучвания показват, че Lcn-2, получен от остеобластите, поддържа глюкозната хомеостаза, чрез

индуциране секреция на инсулин и подобряване на глюкозния толеранс и инсулиновата чувствителност [137]. Lcn-2, синтезиран от остеобластите, инхибира апетита. Той преминава кръвно-мозъчната бариера, свързва се с меланокортин-4 рецептор (MC4R) в хипоталамуса и активира MC4R-зависим анорексигенен път [13]. Синтезираният от остеобластите Ngal стимулира β -клетъчна пролиферация, секрецията на инсулин и метаболизма на глюкозата. Инактивирането на експресията на Lcn-2 от остеобластите при мишки води до инсулинова резистентност и панкреатична β -клетъчна дисфункция с намаляване броя и размера на β -клетките на панкреаса, което е причина за намалена секреция на инсулин след глюкозно натоварване. Хронично приложение на екзогенен Lcn-2 при затлъстели мишки намалява приема на храна, телесната маса и подобрява утилизацията на глюкоза. Wang W et al. (2018) оценява връзката на LCN-2 с показателите, асоциирани с глюкозната и костната хомеостаза при пациенти със ЗД II. Те установяват сигнификатно по-високи циркулиращи нива на LCN-2 при пациентите със ЗД II в сравнение с групата с нормален глюкозен толеранс ($p = 0.005$). Авторите посочват, че LCN-2 корелира положително с концентрацията на серумния инсулин на гладно ($r = 0.262$, $p = 0.001$), НОМА-IR ($r = 0.185$, $p = 0.026$) и НОМА-b ($r = 0.306$, $p < 0.001$) и отрицателно с плазмената глюкоза на гладно ($r = -0.218$, $p = 0.006$). Костната минерална плътност на шийката на бедрената кост, type 1 N-terminal procollagen и collagen type 1 cross-linked C-telopeptide са независими предиктори за LCN-2 при пациенти със ЗД II. Проучването обобщава, че LCN-2 изпълнява ролята на посредник между костната и глюкозната хомеостаза. Хипергликемията инхибира костния метаболизъм, намалява костната маса и сила и стимулира експресията на LCN-2 от остеобластите. Повишените плазмени нива на LCN-2 стимулират секреция на инсулин, което подобрява глюкозната хомеостаза и костния метаболизъм [199]. Mosialou I et al. (2020) извършват 5-годишно проспективно проучване, за да оценят ролята на NGAL в метаболитната регулация при затлъстяване и диабет. Изследват 88 жени в постменопауза с преддиабет и установяват силна положителна корелация между плазмените нива на LCN-2 и BMI ($r = 0.30$, $p = 0.004$), обиколка на талията ($r = 0.29$, $p = 0.006$), серумната концентрация на инсулин ($r = 0.39$, $p = 0.0004$) и НОМА-IR ($r = 0.37$, $p = 0.0006$). Корелационните зависимости между плазмените нива на LCN-2 и BMI, обиколка на талията и НОМА-IR са по-изявени в групата с BMI >35 kg/m². По време на 5-годишното проследяване, 33 пациента (37.5%) от групата с преддиабет развиват ЗД II, проведените анализи установяват, че изходната стойност на LCN-2 не може да предскаже риск от развитие на ЗД II. Проучването включва и кохорта от 55 жени в постменопауза със ЗД II, данните показват статистически значима отрицателна корелация между LCN-2 със серумния инсулин и с HbA1c (β insulin = -0.002 , $p = 0,037$ и β Hb1Ac = -0.069 , $p = 0.032$). Концентрацията на NGAL, измерена при пациенти със ЗД тип II (87.28 ± 5.1 ng/mL), е в диапазона на резултатите, измерени при лицата

с преддиабет ($81.9 \pm 29.4 \text{ ng/mL}$). Взети заедно, тези резултати показват, че докато увеличените нива на циркулиращ LCN-2 са показателни за метаболитна дисрегулация в началото на инсулиновата резистентност в преддиабетно състояние, те стават показателни за по-добър метаболитен контрол при ЗД II. Тази двуфазна връзка между LCN-2 и прогресията на болестта обяснява защо не може да бъде използван за оценка на риска от развитие на диабет. Повишението на LCN-2 с появата на инсулинова резистентност най-вероятно отразява компенсаторен защитен отговор с цел подобряване на β -клетъчна функция и намаляване на хипергликемията [137]. В контраст на това, Yildirim ZY et al. (2015) констатираат сравними резултати между нивата на uNGAL и UNC сред пациентите с лош и добър контрол на ЗД I. Те посочват липсата на корелация между концентрацията на uNGAL и стойностите на HbA1c, общ холестерол, триглицериди, LDL-холестерол, HDL-холестерол в изследваната кохорта пациенти със ЗД I [214].

5.2.2. NGAL като маркер за ССЗ при пациенти със ЗД

ССЗ представляват основната причина за смърт и заболяемост сред пациентите със ЗД. Пациенти със ЗД тип II имат 2 – 4 пъти по-висок сърдечно-съдов риск в сравнение с лица без диабет, ЗД е свързан със 75% увеличение на смъртността при възрастни [54]. Проучванията показват сигнификантно по-високи плазмени нива на LCN-2 при пациенти с ИБС и метаболитен синдром в сравнение с контроли (142). Hemdahl AL et al. (2006) демонстрират повишена експресията на Lcn-2 в атеросклеротичните плаки при модели с животни [92]. В Ngal е силно индуциран в интимата след ангиопластика. В резултат на съдовото увреждане настъпва NF- κ B-зависима експресия на Ngal в съдовите гладко-мускулни клетки. Произведеният Ngal взаимодейства с MMP-9 и участва в процеса на съдово ремоделиране атеросклеротичната плака. Клетки на възпалението, каквито са активираните неутрофили се откриват в плаки, уязвими на руптура, повишавайки плазмената концентрация на LCN-2. металопротеиназите, което води до дисбаланс в протеолитичната активност и дестабилизация на плаката [43]. Xiao Y et al. (2013) посочват, че циркулиращите нива на LCN-2 корелират положително с дебелината на интима медията на каротидната и феморалната артерия при пациенти със ЗД II. Пациентите със субклинична атеросклероза имат значително по-високи плазмени концентрации на LCN-2 в сравнение с тези без това усложнение ($112.9 \mu\text{g/L}$ спрямо фактор за субклинична атеросклероза при пациенти със ЗД II. Авторите посочват ролята на

този липокалин в патогенезата на съдовите усложнения при диабет и възможната перспектива за използване на LCN-2 като биомаркер за оценка на риска от кардио-васкуларни заболявания при пациенти със ЗД II (208). Ong KL et al. (2020) демонстрират корелация на LCN-2 с редица сърдечно-съдови рискови фактори при пациенти със ЗД II. Те установяват, че кавказката раса, по-високият BMI, фибриноген и хомоцистеин и по-ниският HDL-холестерол, аполипопротеин А-II и eGFR са независими предиктори за по-високи нива на LCN-2. Изходните нива на LCN-2 са свързани с по-висок риск от нови ССЗ и микроваскуларни усложнения в продължение на 5 години при пациенти със ЗД II [149]. Zubiri H et al. (2020) констатират сигнификантно по-високи плазмени концентрации на NGAL при пациенти с исхемична болест на сърцето (ИБС) в сравнение с контроли (81.95 pg/mL vs 357.2 pg/mL), cut-off стойност на pNGAL – 193 pg/mL, отдиференцира пациентите с ИБС с диагностична чувствителност и специфичност 100% [219]. Chong JH et al. (2019) посочват, че повишени нива на pNGAL се асоциират с по-висок дългосрочен риск от хоспитализация и смърт от коронарна болест на сърцето, независимо от конвенционалните рискови фактори и сърдечни биомаркери. Пациентите в трети и четвърти квартил на стойностите на pNGAL имат съответно 1.61 и 1.97 пъти по-висок дългосрочен риск от сърдечно-съдов инцидент в сравнение с пациентите в първи квартил [45].

5.2.3. NGAL като маркер за ИПП при пациенти със ЗД

Инфекциите на пикочните пътища (ИПП) са често срещано усложнение при пациенти със ЗД. Най-честите причинители на ИПП при пациенти със ЗД са *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. и др. Много често тези бактерии са резистентни на лечение на ИПП. Нивата на NGAL се повишават до 12 часа след настъпване на инфекцията и достигат своя пик в рамките на 3 дни. Смята се, че повишението на uNGAL в хода на ИПП се дължи на увеличено освобождаване от активирани неутрофили и повишена експресия от увредените тубуларни клетки. Той има директен бактериостатичен ефект като блокира сидерофорите на грам-отрицателните бактерии [94]. Проспективно проучване, оценяващо диагностичната ефективност на uNGAL в диагностиката на ИПП при деца, установява сигнификантно по-високи нива на uNGAL сред пациентите с ИПП в сравнение с контроли (215.1 ng/mL vs 4.4 ng/mL), чувствителност – 97.1%, специфичността е 95.6% с AUC-ROC – 0.978. Авторите посочват, че позитивирането на теста за левкоцитна естераза и нитрити и от оцветяването по Грам, със сходна диагностична специфичност [125]. Kim BK et al. (2017) оценяват ролята на pNGAL в

диагностиката на остър пиелонефрит при деца с фебрилни инфекции на пикочните пътища. Сигнификантно по-високи нива на pNGAL са установени при пациентите с остър пиелонефрит в сравнение с тези с инфекция на долните пикочни пътища (339.6ng/mL vs чувствителност 86.4%, специфичност – 84.8% с AUC-ROC – 0.893. pNGAL показва по-добра диагностична ефективност от procalcitonin, CRP и общ левкоцитен брой в диагностиката на острия пиелонефрит при деца [111]. В своя системен обзор Shaikh K et al. (2021) обобщават, че uNGAL е обещаващ маркер за диагностициране на ИПП, показващ по-добра диагностична ефективност от теста за левкоцитна естераза. Те посочват необходимостта от валидиране на uNGAL като маркер за ИПП, изместващ левкоцитната естераза. Проучването посочва, че pNGAL няма нужната диагностична ефективност за диагностициране на острия пиелонефрит и използването му в диагностиката изисква допълнителни изследвания [169].

NGAL присъства в урината под различна форма: мономер, димер и като комплекс с MMP-9, но повишението и преобладаването на една от тях може да предскаже произхода му. Бъбречните епителни клетки секретират главно мономерната форма, докато неутрофилите освобождават главно димерната форма. Повишението в урината, на мономерните и до известна степен хетеродимерните форми на NGAL се асоциира с тубулоинтерстициално увреждане, докато повишението на хомодимерните и в по-малка степен мономерните форми – с левкоцитурия. Cai L et al. (2010) посочват необходимостта от разработването на антитела за имуноанализ, които преференциално да идентифицират мономерната форма на NGAL, с оглед повишаване на специфичността на анализа в диагностиката на тубулоинтерстициалното бъбречно увреждане [39]. Decavele AS et al. (2011) установяват корелация между броя на левкоцитите в урината и концентрацията на uNGAL. Те предлагат математическа корекция в стойностите на uNGAL при наличие на пиурия ($> 100 \times 10^9/l$) и концентрация на NGAL в урината $> 100 \mu g/L$ [57].

– необходимост от стандартизация на анализа

Към момента няма налични международни препоръки или насоки при анализа на NGAL, което води до редица ограничения при лабораторната му оценка. Настоящите имуноанализи показват ниска диагностична специфичност, тъй като не могат да отдиференцират мономерната форма на NGAL, която е специфична за тубуларно увреждане. Липсва достатъчно информация за биологичната вариация, източниците на аналитична интерференция, оптималния биологичен материал за анализ, а данните в литературата показват вариация в изведените референтни граници и диагностични прагове. С оглед липсата на стандартизация, референтните граници и cut-off стойности на pNGAL и uNGAL са в

зависимост от използвания метод, платформа, биологичния материал за анализ, подбора и разпределението на изследваната група [47, 98]. Посочените в различните проучвания средни и cut-off стойности в диагностиката на ДБЗ се различават значимо помежду си, което може да се обясни и с хетерогенните условия за анализ. Сравнителен анализ на аналитичните характеристики на няколко налични в търговската мрежа анализи за NGAL, докладва лоша възпроизводимост в стойностите на NGAL получени с част от оценяваните имуноанализи. Те посочват за неприложимо сравнението на резултатите от различни проучвания, при които се използват различни методи и аналитични платформи и подчертават необходимостта от хармонизиране и стандартизиране на анализа [110].

6. Обобщен анализ на литературата

ДБЗ е водеща причина за заболяемост и смъртност сред пациентите със ЗД. С оглед ограниченията на AER и eGFR е необходимо въвеждането и валидирането на нови маркери за ранна диагностика на ДБЗ. Такъв потенциален маркер може да бъде NGAL. Данните в литературата посочват NGAL като маркер с добър диагностичен профил в диагностиката на ДБЗ. Стойностите на NGAL корелират с прогресията на албуминовата екскреция, със спада на GFR и с тежестта на бъбречното увреждане. NGAL е определян като ранен маркер за ДБЗ, който индикира развитието на бъбречна дисфункция, преди повишението на албуминовата екскреция. Определените cut-off стойности демонстрират добра до висока ефективност на NGAL в разграничаване на пациентите с ДБЗ с нормална AER от здрави лица [11, 107, 116, Редица проучвания посочват NGAL като показател за прогресия на ДБЗ, стратифициращ риска от развитие на ТБН [18, 147, 165]. Въпреки това NGAL е модулатор на инсулиновата сигнализация и неговите нива са повишени и при пациенти с диабет и без ДБЗ, повишените нива на pNGAL и uNGAL могат да са резултат и на често срещаните придружаващи заболявания на ЗД – ССЗ и ИПП [21, 94, 125, 137, 208]. Всичко това налага необходимостта от допълнителни изследвания за изясняване ролята на NGAL в диагностиката на ДБЗ.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Да определим диагностичната надеждност на NGAL като маркер за ДБЗ при пациенти със ЗД I и ЗД II. В този контекст сме поставили конкретни задачи.

Задачи

1. Да въведем и верифицираме имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL на биохимичен анализатор ADVIA 1800.

2. Да определим възрастово и полово зависими референтни граници за българската популация на NGAL в плазма и урина, измерени чрез имунотурбидиметричен анализ.
3. Да оценим биологичната вариация на pNGAL, uNGAL и UNC в референтните групи.
4. Да определим диагностичната надеждност и клиничната приложимост на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД II.
5. Да определим диагностичната надеждност и клиничната приложимост на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД II.
6. Да определим диагностичната надеждност и клиничната приложимост на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД I.
7. Да определим диагностичната надеждност и клиничната приложимост на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД I.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Това проспективно проучване е проведено в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна за периода от – 2021 год. Протоколът за изследване е одобрен от Комисията по етика на научните изследвания към МУ – Варна. Всички участници в проучването са получили и попълнили протокол за информирано съгласие.

1. За въвеждането и верифицирането на латекс усилен имунотурбидиметричния анализ, е използван реагентен кит (NGAL Test™ Reagent Kit – ST001CA), калибратори (NGAL фирма BioPorto Diagnostics A/S (Дания). Анализът е извършен на биохимичен анализатор ADVIA 1800. За построяването на 6-точкова калибрационна крива е използван калибрационният сет на производителя Bioporto. За верифициране на теста и за валидиране на аналитичните серии са използвани две нива контролен материал в диагностично значими области от контролния кит на производителя Bioporto.
2. За извеждането на референтни граници на NGAL в плазма и урина за българската популация е извършено научно изследване с:
 - 2.1. Обект на научното изследване – 127 здрави доброволци.
 - 2.2. Предмет на научното изследване – определяне на референтни граници за NGAL в плазма и урина за българската популация и оценка на биологичната вариация на маркерите.
 - 2.3. Място на научното изследване – всички доброволци са преминали през МДЛ Клинична

лаборатория към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Лабораторните изследвания са извършени в МДЛ Клинична лаборатория към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.

2.4. Характер на наблюдението – проспективно проучване.

2.5. Дизайн на научното изследване – в научното проучване, което цели да определи референтни граници за NGAL, са включени 135 доброволци. Здравословното състояние на лицата в референтната група е оценено с помощта на анкетен метод и набор от лабораторни изследвания: кръвна картина, глюкоза, урея, креатинин, общ холестерол, триглицериди, полуколичествено изследване и седимент на урина и е изчислен eGFR. Резултатите от кръвната картина и от изследването на урината са използвани като изключващите критерии, а всички останали лабораторни параметри са включени в обработката на данните. Приложени са следните критерии:

2.5.1. Включващи критерии: клинично здрави лица, без анамнестични и лабораторни данни за остро или хронично заболяване и/или прием на медикаменти с нефротоксично действие.

2.5.2. Изключващи критерии: анамнеза за остро или хронично бъбречно заболяване или друго системно заболяване с потенциален риск от вторично бъбречно засягане, злокачествени заболявания, системни или локални инфекции, артериална хипертония, тиреоидни заболявания, ревматологични заболявания, прием на медикаменти с установено нефротоксично действие или кортикостероидни препарати, бременност, констатирани повишени стойности на урея, креатинин, глюкоза, патологични промени в кръвната картина, патологична находка в урината, eGFR <60 mL/min/1.73 m². При 5-ма от възрастните доброволци и при 3 от децата са констатирани критерии за изключване от научното изследване.

2.5.3. Лицата, които покриват включващите критерии, са 127 и са разделени в групи:

Референтна група от здрави лица >18 год. - 85 здрави възрастни лица.

Референтна група от здрави лица < 18 год. - 42 здрави деца.

3. За оценка на диагностичната надеждност на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за ДБЗ при пациенти със ЗД е извършено научно изследване с:

3.1. Обект на научното изследване – 167 пациенти със ЗД.

Предмет на научното изследване – оценка на диагностичната надеждност на NGAL като маркер за ДБЗ при пациенти със ЗД II и ЗД I.

Място на научното изследване – пациентите са насочени от клиницисти от клиниката по ендокринология и болести на обмяната и Първа детска клиника към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Лабораторните изследвания са извършени в МДЛ Клинична лаборатория към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.

Характер на наблюдението – проспективно сравнително проучване.

Дизайн на научното изследване – в проучването са включени 177 пациенти със ЗД II и ЗД I. За оценка на здравословното състояние и за целите на клиничното проучване при пациентите със ЗД са изследвани: кръвна картина, креатинин, урея, общ холестерол, триглицериди, HDL-холестерол, LDL-холестерол, HbA1c, полуколичествено изследване и седимент на урина, креатинин и албумин в урина, изчислени са ACR, eGFR и BMI. Резултатите от кръвната картина и от изследването на урината са използвани като изключващите критерии, а всички останали лабораторни параметри са включени в обработката на данните. Приложени са следните критерии:

- 3.5.1. Включващи критерии: пациенти с потвърдена диагноза ЗД тип I с давност над 5 години и пациенти с потвърдена диагноза ЗД тип II, спрямо критериите на ADA и
- 3.5.2. Изключващи критерии: остри и хронични бъбречни заболявания извън ДБЗ, злокачествени заболявания, системни или локални инфекции, ревматологични заболявания, тиреоидни заболявания, бременност, прием на нефротоксични медикаменти или кортикостероидни препарати, левкоцитоза, наличие на левкоцитурия, $eGFR < 15 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. При 7 от пациентите със ЗД II и при 3 от пациентите със ЗД I са констатирани критерии за изключване от научното изследване.
- 3.5.3. Пациентите, които отговарят на включващите критерии, са 167 и са разделени в две групи:
 - 3.5.3.1. Пациентска група от лица със ЗД II - 92-ма възрастни пациенти със ЗД II;
 - 3.5.3.2. Пациентска група от лица със ЗД I - 75 деца със ЗД I.
- 3.5.4. Класификация на групите пациенти: пациентите със ЗД I и ЗД II са разделени спрямо стойностите на ACR, eGFR, HbA1c и наличието на ДБЗ. Съпоставени са средните стойности на pNGAL, uNGAL и UNC както между отделните подгрупите пациентите, така и със съответните им контролни групи.
- 3.5.5. Оценена е корелационната връзка между pNGAL, uNGAL и UNC с маркерите за бъбречно увреждане (ACR, eGFR, урея, креатинин), за метаболитен контрол (общ холестерол, триглицериди, LDL-холестерол и HDL-холестерол) и за гликемичен контрол (HbA1c).
- 3.5.6. Изведени са cut-off стойности за бъбречно увреждане при ЗД.
- 3.5.7. Информацията, получена от участниците в проучването, е съхранена в Катедрата по клинична лаборатория към МУ – Варна за срок от 5 години.

4. За определяне на NGAL и описаните лабораторни параметри е взета кръв при стандартизирани условия – сутрин на гладно (след 12 h хранителна пауза) и първа сутрешна урина. Използвани са следните биологични материали:
 - 4.1. Пълна кръв, получена във вакутейнер с антикоагулант K₂EDTA, от който са изследвани кръвна картина и HbA_{1c}.
 - 4.2. Хепаринова плазма, получена във вакутейнер с антикоагулант литиев хепарин, който е центрифугиран за 15 минути на 2500 G. В хепаринова плазма са изследвани pNGAL, урея, креатинин, общ холестерол, HDL-холестерол и LDL-холестерол, триглицериди.
 - 4.3. Първа сутрешна урина – в количество 20 mL. Извършено е полуколичествено химично изследване и е оценен седимент в урина. Количествените параметри в урината са определени след центрифугиране на урината за 15 мин. на 2500 G, в супернатанта са изследвани концентрация на uNGAL, креатинин и албумин.
 - 4.4. Пробите са изследвани до два часа след получаване на биологичния материал за всички параметри освен за NGAL. Пробите за NGAL – плазма и урина, са прехвърлени в етикирани вакутейнери без адитив. Материалите са съхранени при - 0°C до извършване на анализа, за период не по-дълъг от 3 месеца. Анализът на pNGAL и uNGAL е извършен поетапно след събиране на подходяща серия.

Методи

1. За верифициране на метода латекс усилен имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL на биохимичен анализатор ADVIA 1800, са оценени следните критерии за аналитична надеждност:
 - 1.1. Извършена е проверка на калибрационната крива и проверка на аналитичния измервателен диапазон: LLOD (Limit of detection), LLOQ (Lower Limit of Quantification) и ULOQ (Upper Limit of Quantification).
 - 1.2. Оценена е невъзпроизводимост в серия.
 - 1.3. Оценена е невъзпроизводимост във време.
 - 1.4. Оценена е пропорционалната системна грешка чрез метода за аналитична откриваемост и е изчислен % recovery.
 - 1.5. Определен е преносът на биологичен материал от проба с висока към проба с ниска концентрация, чрез % carryover.
 - 1.6. Оценена е недостоверност и неточност.
 - 1.7. Архивиране на резултатите. Всички резултати получени в хода на изпитването – пациентски резултати, контролни резултати и контролни карти, са систематизирани, обработени и съхранени в софтуерната програма на анализатора, в табличен вид на

файлове EXCEL (Windows Office) и на хартиен носител.

2. За извеждане на референтни граници и за определяне на диагностичната надеждност на метода са използвани следните методи:

2.1. Анкетен метод. Преди получаването на биологични материал всички участниците в проучването са анкетирани от изследователя или от клиницисти (специалисти по ендокринология и детска ендокринология), което цели да установи наличието на критерии за включване в проучването.

2.2. Лабораторен анализ. Цитираните лабораторни тестове са извършени в Клинична лаборатория към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна:

в плазма и урина е изследван с латекс усилен имунотурбидиметричен анализ на биохимичен анализатор ADVIA 1800.

2.2.2. Съотношението UNC е калкулирано по формулата $uNGAL/uCreatinine \times 1000$, резултатите са представени в $\mu g/mol$.

2.2.3. Концентрацията на албумин в урина е оценена с имунотурбидиметричен анализ на биохимичен анализатор – ADVIA 1800.

2.2.4. ACR е калкулиран по формулата $AER/uCreatinine \times 1000$, резултатите са представени в g/mol .

2.2.5. Креатинин в плазма и урина е изследван с Jaffe-кинетичен метод на биохимичен анализатор ADVIA 1800, проследим до ID-MS .

2.2.6. Урея в плазма е определена с двустъпален ензимен тест уреаза/UV спектрофотометрия на биохимичен анализатор ADVIA 1800.

2.2.7. Общ холестерол е измерен с тристъпна ензимна реакция със завършек на Триндлер на биохимичен анализатор ADVIA 1800.

2.2.8. Триглицериди са определени с тристъпна ензимна реакция със завършек на Триндлер на биохимичен анализатор ADVIA 1800.

2.2.9. HDL-холестерол е определен с директен ензимен метод с елиминация/каталаза на биохимичен анализатор ADVIA 1800.

2.2.10. LDL-холестерол е изчислен по формулата на Friedewald's при стойност на триглицеридите $< 4.5 \text{ mmol/L}$ – $LDL\text{-chol} = TChol - (HDL\text{-chol} + TG/2.2)$. При стойност на триглицеридите $> 4.5 \text{ mmol/L}$, LDL-холестерол е измерен с директен ензимен метод с елиминация/каталаза на биохимичен анализатор ADVIA 1800.

е определен с метод, стандартизиран съгласно DCCT/NGSP, на биохимичен анализатор ADVIA 1800. Резултатите са представени в %, изчислен от съотношението $HbA1c/Total \text{ Hemoglobin (THb)}$. HbA1c е измерен чрез турбидиметричен имуноанализ. THb е измерен чрез колориметричен метод.

2.2.12. Кръвна картина. Показателите от кръвната картина са определени на 5-diff хематологичен анализатор Sysmex XN 1000, използващ принципите на флуоресцентна поточна цитометрия с използване на полупроводников лазер и хидродинамично фокусиране. Хематологичният анализатор прилага импедансен и оптичен метод при отчитане брой кръвни клетки, флуоресцентна флоуцитометрия със странична флуоресцентна светлина, предно и странично разсеяна светлина при диференциалното изброяване на левкоцитите и безцианиден колориметричен метод със sodium lauryl sulphate при измерване на хемоглобин.

2.2.13. Полуколичествено химично изследване на урина и седимент в урина са определени на комбинирана система H-800/FUS-100, работеща на принципа на рефрактометрия с 11 параметрови тест ленти за суха химия и проточна цитометрия.

2.2.14. За изчисление на eGFR при възрастни е използвана формулата CKD-EPI.

$$\text{GFR} = 141 \min(\text{Scr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Scr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{Age}} \times 1.018 \text{ (ако е жена)} \times 1.159$$

(ако е чернокож), в която Scr - серумен креатинин в $\mu\text{mol/L}$, κ – 61.9 за жени и или 1, max – показва максимума на Scr/ κ или 1.

2.2.15. За изчисление на eGFR при деца е използвана актуализираната формула Bedside Schwartz и формулата CKD-EPI40.

$(36.2 \times \text{височина в см.}) / \text{серумен креатинин в } \mu\text{mol/L}$

е базирана на уравнението CKD-EPI, но с коригиран спрямо възрастта серумен креатинин към възрастта 40 години, корекцията на серумния креатинин е извършена по следните формули:

при момчета: $\text{Ln(креатинин)} = \text{Ln(креатинин)} + 0.259 \times (40 - \text{възраст}) - 0.543 \times / \text{възраст} - 0.00763 \times (40^2 - \text{възраст}^2) + 0.0000790 \times (40^3 - \text{възраст}^3)$

при момичета: $\text{Ln(креатинин)} = \text{Ln(креатинин)} + 0.177 \times (40 - \text{възраст}) - 0.223 \times 40 / \text{възраст} - 0.00596 \times (40^2 - \text{възраст}^2) + 0.0000686 \times (40^3 - \text{възраст}^3)$

2.3. Статистически методи. В статистическата обработка на данните са използвани възможностите на статистическия пакет SPSS 27 и са приложени следните методи.

2.3.1. Тест на Shapiro–Wilk’s за оценка нормалността на разпределението на непрекъснатите променливи.

2.3.2. Непрекъснатите променливи, които следват нормално разпределение, са представени чрез средна стойност и стандартно отклонение (Mean и SD).

2.3.3. Непрекъснатите променливи, които не следват нормално разпределение, са

представени чрез медиана и интерквартилен обхват (Median и IQR).

2.3.4. Параметричният тест - t-test на Student-Fisher е използван при сравнение на независими променливи, които следват нормално разпределение.

2.3.5. Непараметричните тестове на Mann–Whitney и Kruskal–Wallis са използвани при сравнение на съответно две и повече групи независими променливи, които не следват нормално разпределение.

2.3.6. За определяне силата и посока на зависимост при променливи с нормално разпределение е приложен корелационен анализ – корелационен коефициент на

2.3.7. За определяне силата и посока на зависимост при променливи, които не следват нормалното разпределение е приложен корелационен анализ - рангов корелационен коефициент на Spearman Rho.

За определяне степента на зависимост и за прогнозиране стойностите на зависима променлива е използван линеен регресионен анализ при интервална зависима променлива и логистична регресия и дискриминантен анализ при категорийна зависима променлива.

2.3.9. Receiver-Operating Characteristic (ROC) криви и Area Under the Curve (AUC) са използвани за оценка на чувствителността и специфичността на лабораторните показатели и за определяне на cut-off стойности.

2.3.10. Използвано е критично ниво на значимост $\alpha=0.05$, като нулевата хипотеза се отхвърля при стойност на p по-малка от α ($p<0.05$).

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL

Откриваемият минимум (LLOD) на NGAL е определен, като е взето под внимание стандартното отклонение (SD) на 10 паралелно измерени празни проби. LLOD е изчислен по формулата $LLOD = 3.3 * SD$ -празната проба, и е равен на 6.00 ng/mL. Долната границата на количествено определяне (LLOQ) се дефинира като сигнал, надвишаващ от пет до десет пъти фоновият шум и е в диапазон от 12.00 ng/mL до 18.00 ng/mL.

За проверка на калибрационната крива са оценени получените стойности за LLOQ (12–18

и подадената от производителя стойност за горна граница на количествено определяне стойности 12 ng/mL, 17.3 ng/mL и 3000 ng/mL. Резултатите за LLOQ при двете използвани проби са: $\bar{x} = 10.46$ ng/mL, CV = 17.52 % ($x_0=12$ ng/mL) и $\bar{x} = 16.42$ ng/mL, CV = 10.12 % Получените резултати са в съответствие с международните изисквания (CV до 20% за LLOQ и до 15% за ULOQ) и в настоящото проучване е приложена линейност на теста от 12 ng/mL до 3000 ng/mL.

За оценка на невъзпроизводимост в серия са извършени 10 паралелни измервания в серия на 4 подобрани проби. За анализ са използвани: 1 проба урина и 3 проби плазма, съответно в референтна, клинично значима и висока област. Пробите са анализирани при спазване на идентични условия (дата, лот № на реактива, оператор). Изчислени са средна стойност (\bar{x}), стандартно отклонение (SD) и коефициент на вариация (CV%). Резултатите са представени в Таблица 10 (Табл. 10).

Таблица 10. Данни от статистическата обработка на възпроизводимост в серия

Проба/конц. област	Брой измервания	\bar{x}	SD	CV%
урина/ниска				
плазма/ниска				
плазма/кл. значима				
плазма/висока				

За оценка на невъзпроизводимост във време са използвани контролните материали на производителя Bioporto в две концентрационни области. Контролните материали са анализирани в 21 работни дни, при идентични условия преди пациентските серии. Изчислени са средна стойност (\bar{x}), стандартно отклонение (SD) и коефициент на вариация (CV%). Резултатите са представени на Таблица 11 (Табл.11).

Таблица 11. Данни от статистическата обработка на възпроизводимост във време

Проба/конц. област	Брой измервания	\bar{x}	SD	CV%
ниска контрола	1	202.69	9.04	4.5
висока контрола	1			2

За оценка на недостоверност и неточност са използвани контролни материали на производителя Bioporto в две диагностично значими области, анализирани в 21 работни дни. Изчислено е процентно отклонение ($d\%$) на средната стойност (\bar{x}) от обявената стойност на производителя (x_0) (Табл. 12). Вътрешният лабораторен качествен контрол е проведен в

съответствие с критериите на Westgard с две нива контролен материал.

Таблица 12. Оценка на недостоверност с контролен материал NGAL Test™ Control

Контролен материал	Брой измервания	x_0	\bar{x}	d%
ниска контрола	1	202	202.69	0.34
висока контрола	1	505		

За оценка на пропорционалната системна грешка е използван методът на аналитичната откриваемост, като е изчислен %recovery. Пригответни са 3 проби, чрез смесване на пациентски проби и концентрирани разтвори. Тестът е извършен и с двата вида биологичен материал - плазма и урина (Табл.13).

Таблица 13. Оценка на аналитичната откриваемост

Вид проба ng/ml	Добавка ng/ml	Съотношение проба:добавка	Добавена концентрация	Намерена концентрация	Аналитичен добив %
плазма - 31	1				
плазма - 31	1				
урина - 41					

За оценка на преноса на биологичен материал от проби с високи към проби с ниски стойности на изпитвания показател е определен % carryover. Използван е следния подход: проба А с висока концентрация е анализирана 3 пъти последователно (A1, A2, A3), последвана от проба с ниски стойности, също изследвана 3 пъти последователно (B1, B2, B3). carryover е оценен по формулата $\% \text{ carryover} = \frac{B1-B3}{A3-B3} \times 100$ (Табл. 14).

Таблица 14. Оценка на % Carryover

Проба А	1208	1166	1236
Проба В	28.5	32.3	32.1
% carryover	-0.29 %		

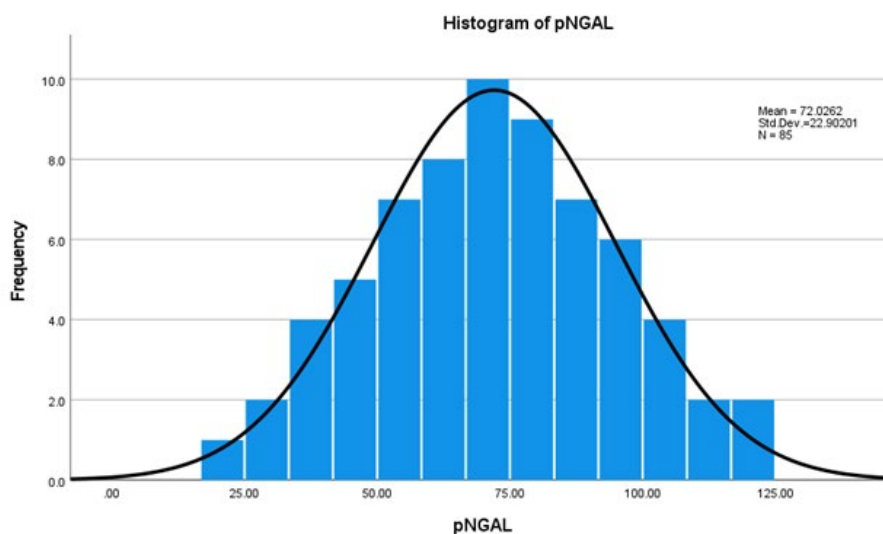
2. Референтни граници на NGAL при възрастни лица. Биологична вариация

В референтна група са включени 90 възрастни доброволци, при 5-ма е установена сигнификантна левкоцитурия и са изключени от последващата обработка на данните. Кохортата, отговаряща на включващите критерии в настоящото проучване, обхваща 85 лица на възраст между 34 – 75 г. (52.9 ± 8.3), от които 44 жени и 41 мъже. Характеристика на контролната група от възрастни лица е представена на таблица 15 (Табл.15).

Таблица 15. Характеристика на контролната група от възрастни лица

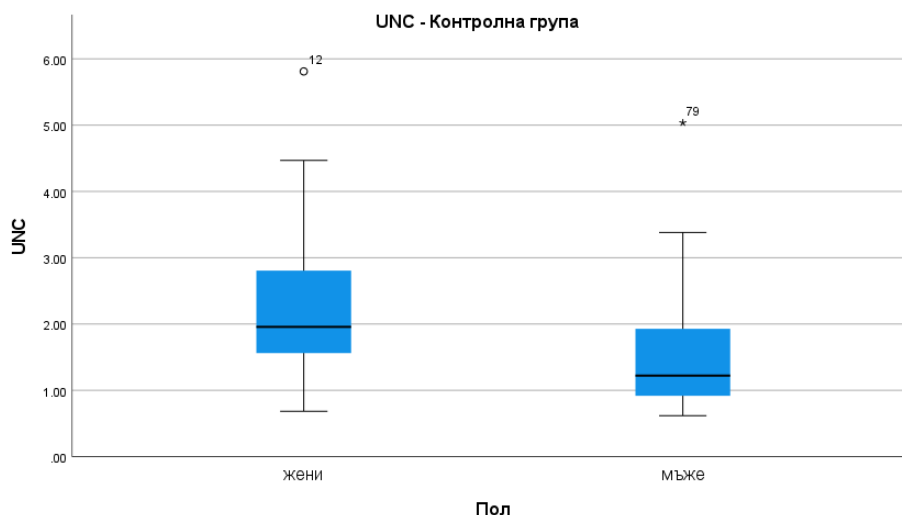
Показател	Мерни единици	М
брой (жени:мъже %)	N (%)	85 (52%:48%)
години	години	5
глюкоза	mmol/L	5
урея	mmol/L	4
креатинин		7
eGFR		9
общ холестерол	mmol/L	5
триглицериди	mmol/L	1
pNGAL	ng/mL	7
uNGAL	ng/mL	2
UNC	µg/mmol	2

Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите за показателите pNGAL, uNGAL и UNC, както и визуалната оценка на хистограмите и P-P Plots, показва липсата на Гаусово разпределение. Тестът на Shapiro–Wilk’s ($p < 0.05$) демонстрира коефициенти за асиметрия и ексцес със $z\text{-value} > 1.96$, което отхвърля нулевата хипотеза за нормално разпределение и за трите показателя. Последващата обработка е извършена след трансформация на данните и непараметрични методи за анализ. След статистическа обработка на резултатите и нормализиране на разпределението е приложен перцентилен метод за изчисление на референтните граници (Фиг.1). Изведените референтни стойности съответстват на 2.5 и 97.5 перцентил, при 95% доверителен интервал. Референтните граници в цялата обследвана референтна група са: за pNGAL – 25-119.49 ng/mL, за uNGAL <52.37



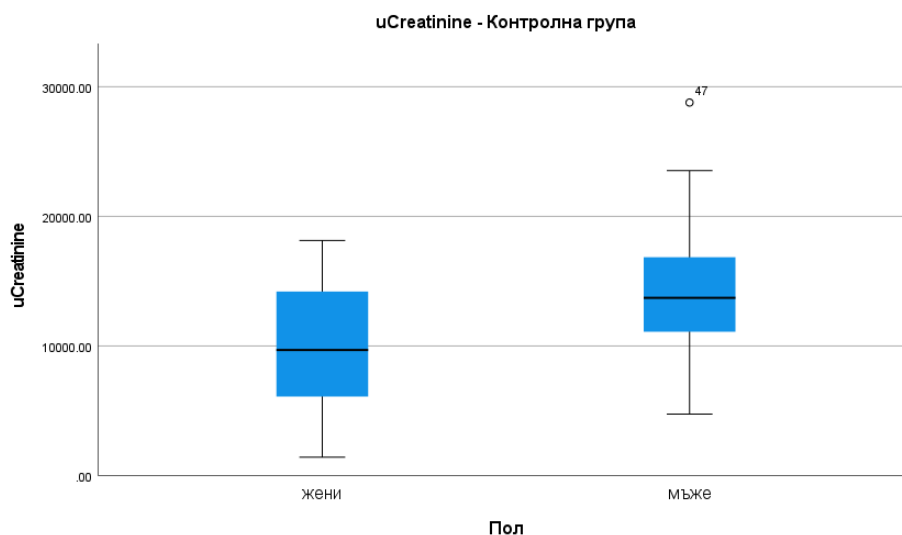
Фиг. 1. Хистограма, представяща нормалното разпределение на трансформираните резултатите за pNGAL в референтната група >18 год.

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL, uNGAL и UNC в цялата референтна група са както следва: 72.65 (52.38-85.75) ng/mL, 14.50 (12.00-23.55) ng/mL и 1.75 (1.25-2.33) мъжете е 12.55 (12.00-23.20) ng/mL. Медианата на UNC при жените е 1.96 (1.56-2.81) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при мъжете е 1.22 (0.90-1.97) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (Фиг.2). Резултатите от теста на Mann–Whitney показват статистически значими по-високи резултати на UNC при жени в сравнение с мъже – жени <6.34 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при мъже < 3.36 $\mu\text{g}/\text{mmol}$.



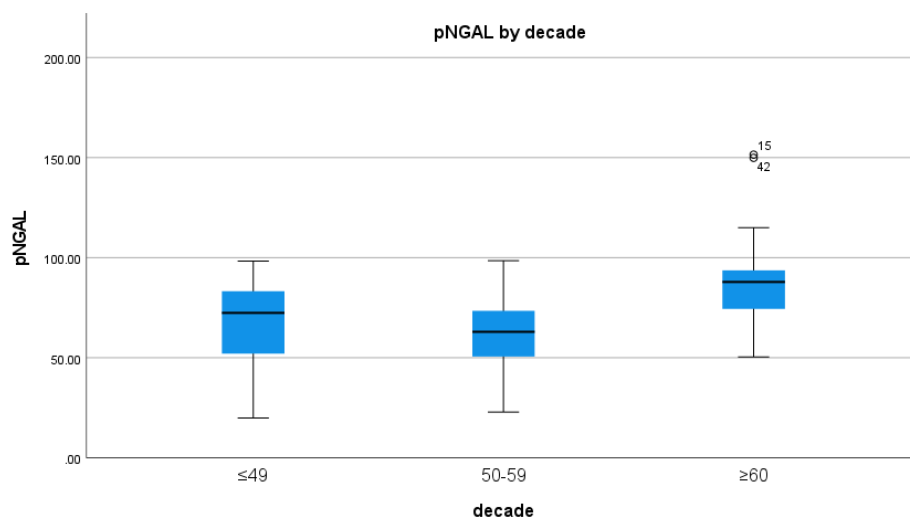
Фиг. 2. Разпределение на резултатите за UNC при жени и мъже в референтната група възрастни лица

Медианата на uCreatinine при жените е 9695 (6073 – 14241) $\mu\text{mol}/\text{L}$ и при мъжете е 13718 статистически значимо по-високи резултати на uCreatinine при мъже в сравнение с жени U =



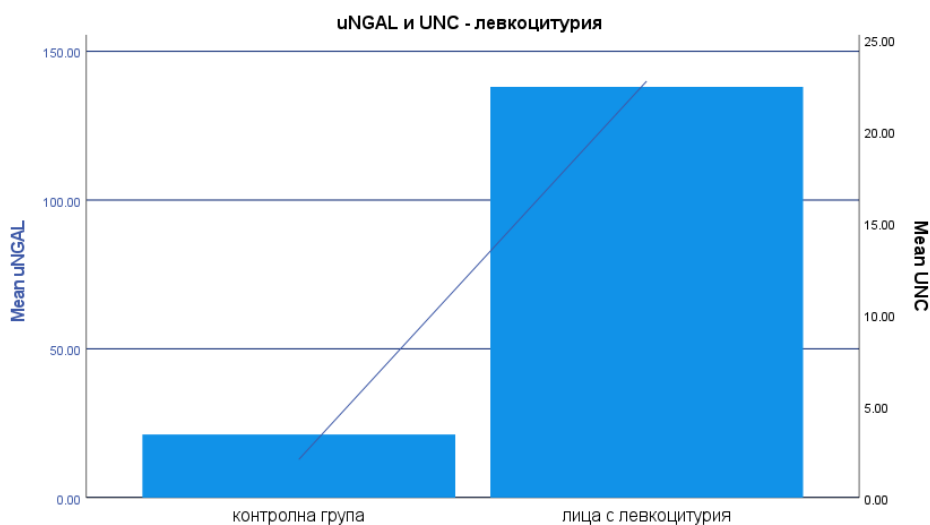
Фиг. 3. Разпределение на резултатите за uCreatinine при жени и мъже в референтната група възрастни лица

Лицата са разделени в три възрастови периода: ≤ 49 г. (N = 30), 50-59 г. (N = 36) и ≥ 60 г. (N = 30). В зависимост от възрастта, медианата и интерквартилният обхват на pNGAL, uNGAL и UNC са както следва: при лица ≤ 49 - pNGAL е 72.4 (49.47-83.42) ng/mL, uNGAL е 18.15 (12.00-24.00) ng/mL и UNC е 1.45 (1.00-2.16) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, във възрастовата декада 50-59 - pNGAL е 63.00 (50.60-75.40) ng/mL, uNGAL е 13.15 (12.00-17.42) ng/mL и UNC е 1.77 (0.93-2.60) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при лица ≥ 60 - pNGAL е 87.90 (74.20-97.30) ng/mL, uNGAL е 23.75 (12.00-33.17) ng/mL и UNC е 1.91 (1.74-2.08) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (Фиг. 4). Медианата на pNGAL при всички лица под 60 г. е 67.70 (50.60-81.60) ng/mL и при лица над 60 г. е 87.90 (74.20-97.30) ng/mL. Резултатите от теста на Mann-Whitney показват сигнификантно по-високи резултати на pNGAL при лицата над 60 години спрямо тези под 60 годишна възраст - $U=200.0$, $p<0.001$, $r=-0.40$. С цел да се изследва асоциацията между стойностите на pNGAL с възрастта и eGFR е използван коефициентът на ранговата корелация Rho. Корелационният анализ показва статистически значима отрицателна корелация между възрастта и eGFR ($\rho=-0.473$, $p<0.001$), между pNGAL и eGFR ($\rho=-0.354$, $p=0.003$), както и положителна корелация между pNGAL и възрастта ($\rho=0.255$, $p=0.035$). Диференцирането на контролната кохорта в три групи доведе до намаляване на броя лица във всяка група и ограничи възможността за извеждането на възрастово зависими референтни граници за



Фиг. 4. Разпределение на резултатите за pNGAL по възрастови периоди в референтната група възрастни лица

При 5-ма от лицата в проучването е установена сигнификантна левкоцитурия и са от изключени от последващата обработка на данните. Средната стойност на uNGAL измерена при тях е $\bar{x}=141.7$ ng/mL и $UNC - \bar{x} = 23.32$ μ g/mmol. Получените резултати за uNGAL и UNC са значимо по-високи от определените референтни граници (Фиг. 5).



Фиг. 5. Mean - uNGAL и UNC при лица без и с левкоцитурия

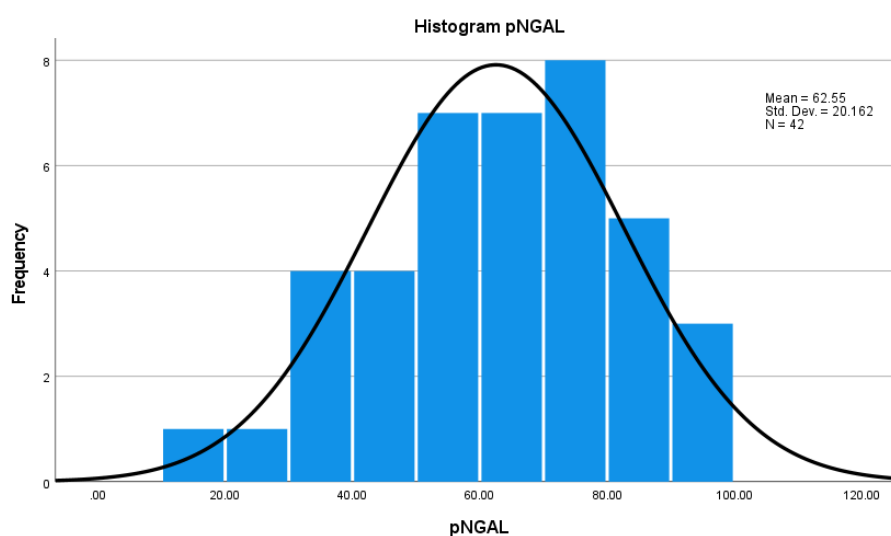
3. Референтни граници на NGAL при деца. Биологична вариация

В референтна група са включени 45 деца, при 3 от тях е установена съответно левкоцитоза, сигнификантна левкоцитурия и протеинурия и са изключени от последващата обработка на данните. Кохортата, отговаряща на включващите критерии в настоящото проучване, обхваща лица на възраст от 5 до 17 г. (12.50 ± 3.69), от които 21 момичета и 21 момчета (Табл.16).

Таблица 16. Характеристика на контролната група от лица под 18 г.

Показател	Мерни единици	М
брой (момчета:момчета)	N (%)	42 (50%:50%)
години	години	1
урей	mmol/L	3
креатинин		5
eGFR		9
глюкоза	mmol/L	4
общ холестерол	mmol/L	4
триглицериди	mmol/L	0
pNGAL	ng/mL	6
uNGAL	ng/mL	1
UNC	µg/mmol	1

Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите за показателите pNGAL, uNGAL и UNC, както и визуалната оценка на хистограмите и P-P Plots показва нормално разпределение на резултатите за pNGAL и липсата на Гаусово разпределение на резултатите за uNGAL и UNC (Фиг. 6). Теста на Shapiro-Wilk's ($p < 0.05$) демонстрира коефициенти за асиметрия и ексцес със z-value > 1.96 , което отхвърля нулевата хипотеза за нормално разпределение на резултатите за uNGAL и UNC. Последващата обработка на резултатите за uNGAL и UNC е извършена след двустъпален подход за трансформация и нормализиране на разпределението на данните. Изведените референтни стойности, които съответстват на 2.5 и 97.5 перцентил, при 95% доверителен интервал в референтна група под 18 г., са: pNGAL < 96.88 ng/mL, uNGAL < 47.30 ng/mL, UNC < 3.48 µg/mmol.



Фиг. 6. Хистограма, представяща нормалното разпределение на резултатите за pNGAL в референтната група под 18 год.

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL, uNGAL и UNC в цялата кохорта са както следва: 66.15 (48.78 – 77.23) ng/mL, 13.70 (12.00 – 22.35) ng/mL и 1.47 (1.15 – 2.21) статистически значима разлика в стойностите на uNGAL и UNC между подгрупите момичета и момчета ($U = 148.5$, $p = 0.094$ и $U = 198.0$, $p = 0.754$). Не се установи сигнификантна корелация и на трите маркера с възрастта (pNGAL – $r = 0.140$, $p = 0.390$, uNGAL – $\rho = 0.129$,

4. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ при ЗД II

3

а

у

ч

Таблица 17. Характеристика на пациентската група със ЗД II

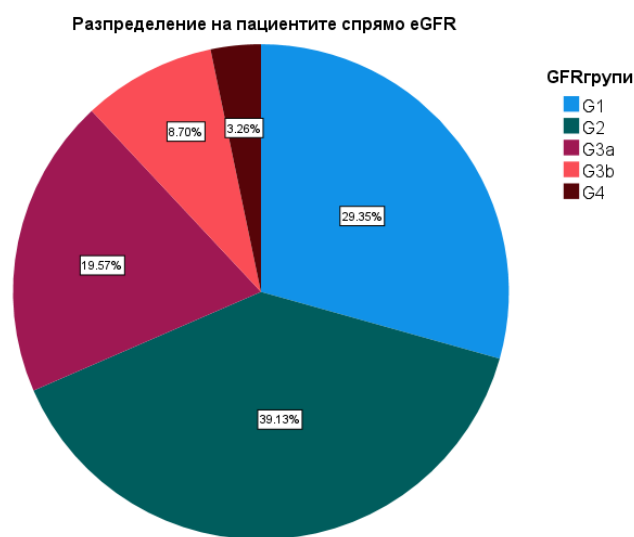
Показател	Пациенти ЗД II n	К n	p
брой	92	85	*
пол жени:мъже (%)	55% : 45%	52% : 48%	= 0.884
години	5	5	< 0.004
глюкоза (mmol/L)	1	5	< 0.001
урей (mmol/L)	7	4	< 0.001
к	9	7	< 0.001
е	7	9	< 0.001
общ холестерол (mmol/L)	5	5	= 0.508
триглицериди (mmol/L)	3	1	< 0.001
HDL-холестерол (mmol/L)	1	*	*
LDL-холестерол (mmol/L)	2	*	*
AER (mg/l)	2	*	*
HbA1c (%)	9	*	*
ACR (g/mol)	2	*	*
pNGAL (ng/mL)	9	7	
uNGAL (ng/mL)	5	2	
UNC (µg/mmol)		2	

Включените лица със ЗД II са разпределени в подгрупи спрямо ACR, eGFR и наличието на ДБЗ. Спрямо нивото на ACR са формирани три групи: A1 при $ACR < 3$ g/mol, A2 при $ACR = 3-30$ g/mol и A3 при $ACR > 30$ g/mol. Спрямо eGFR са формирани две групи: $\leq G2$ при $eGFR \geq 60$ mL/min/1.73m² и $\geq G3$ при $eGFR < 60$ mL/min/1.73m². Пациентите са разделени само в

а

и

две категории в зависимост от eGFR, тъй като при разпределението им от G1 до G4 (G5 е изключващ критерий за проучването) се намалява броят лица в отделните подгрупи, което ограничава възможността за статистическа обработка на данните (Фиг. 7).



Фигура 7. Разпределение на пациентите със ЗД II, спрямо eGFR – категория G1 до G4

Съгласно насоките на KDIGO 2020, възприетите в настоящото проучване критерии за диагностициране на ДБЗ са $ACR > 3 \text{ g/mol}$ и/или $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$. Спрямо така дефинираните критерии са формирани две групи: ЗД II без ДБЗ и ЗД II със ДБЗ. Характеристиките на подгрупите е представена на Таблица 18 (Табл. 18).

Таблица 18. Характеристика на групите пациенти със ЗД II

Категория	Критерий	Mean \pm SD	N (жени:мъже)	Възраст
A1				5
A2	$ACR \text{ 3 – 30 g/mol}$			5
A3			21 (10:11)	6
$\leq G2$	$eGFR \geq 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$	e	63 (36:27)	5
$\geq G3$	e	e	29 (15:14)	6
ЗД без ДБЗ	3 g/mol и $eGFR \geq 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$	A €	36 (16:20)	5 6
ЗД с ДБЗ	$ACR > 3 \text{ g/mol}$ и/или e		56 (35:21)	5 6

Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите за pNGAL, uNGAL и UNC в цялата кохорта пациенти със ЗД II и в отделните подгрупи показва липсата на Гаусово разпределение. Тестът на Shapiro–Wilk’s ($p < 0.05$) демонстрира коефициенти за асиметрия и ексцес със z-value > 1.96 , което отхвърля нулевата хипотеза за нормално разпределение и за

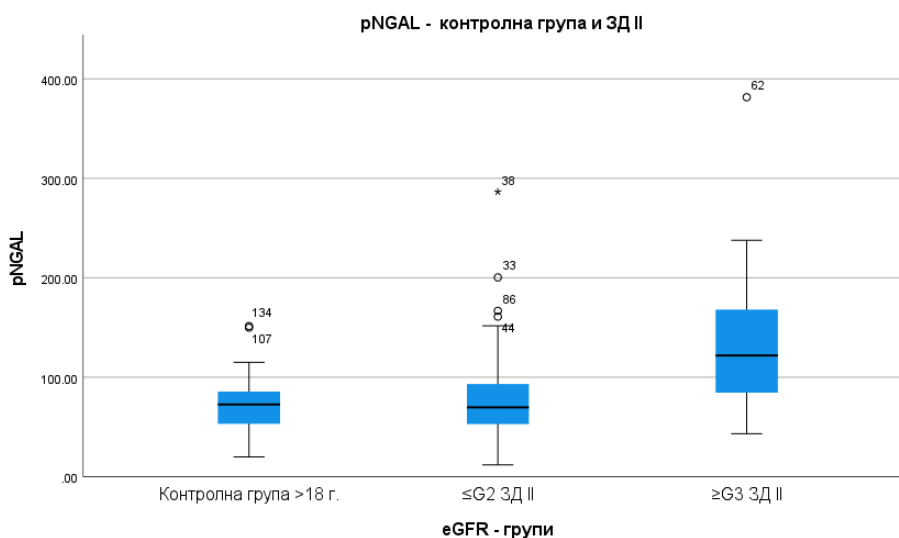
трите показателя във всяка една от обследваните подгрупи. Последващата статистическа обработка на данните е извършена с непараметрични методи за анализ.

като маркер за диагноза на ДБЗ при пациенти със ЗД II

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в цялата пациентска кохорта е 79.10 по-високи резултати на pNGAL при пациенти със ЗД II в сравнение с контролната група (79.10

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в трите подгрупи, разделени в зависимост от ACR, са: A1 – 71.10 (52.30 – 105.30) ng/mL, A2 – 82.10 (51.60 – 102.47) ng/mL и A3 – 121.70 – 171.20) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis не установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между отделните подгрупи пациенти ($\chi^2(2) = 4.250$, $p = 0.119$). Спрямо контролната група сигнификантно по-високи резултати за pNGAL имат само пациентите в A3 (121.70 vs 72.03 ng/mL), $U = 332.0$, $p = 0.007$, $r = -0.293$.

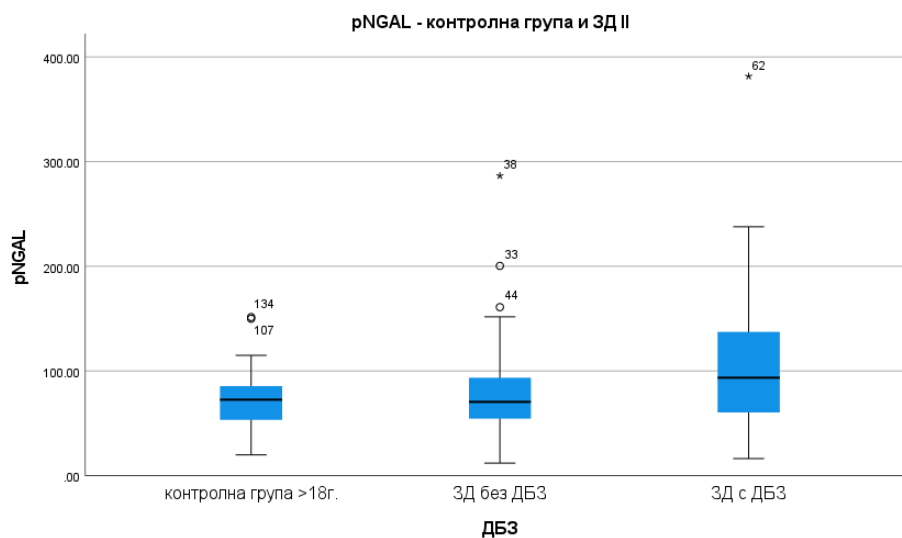
Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо Mann–Whitney установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между отделните подгрупи пациенти $U = 278.0$, $p < 0.001$, $r = -0.406$. Спрямо контролната група сигнификантно по-високи стойности за pNGAL имат само пациентите в подгрупа $\geq G3$ (121.90



Фигура 8. Разпределение на резултатите за pNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД II, разделени спрямо eGFR

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL при пациентите със ЗД II без ДБЗ е 70.45

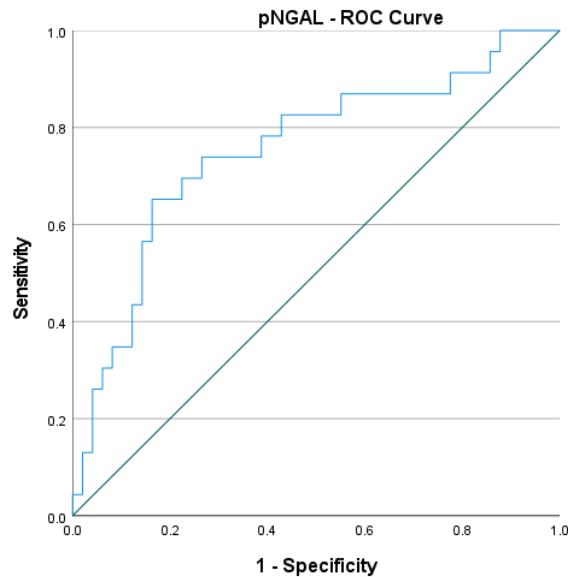
Wallis установи, че концентрацията на pNGAL в отделните пациентски подгрупи и контролната група се различават статистически значимо помежду си ($\chi^2(2) = 7.675$, $p = 0.022$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна само между пациентите с ДБЗ и контролната група (93.55 vs 72.03 ng/mL), $U=918.50$, $p=0.005$, $r = -0.270$ (Фиг. 9).



Фигура 9. Разпределение на резултатите за pNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД II без ДБЗ и с ДБЗ.

ROC анализът демонстрира, че pNGAL има добра диагностична ефективност в отидиференциране на пациенти със ЗД II с понижен eGFR ($eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$) от тези със запазен eGFR ($eGFR \geq 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$), с AUC-ROC – 0.753. При cut-off – 121.65 ng/mL, стойност над определената горна граница на референтния интервал, тестът има диагностична чувствителност и специфичност – 57% и 84%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – LR+ 3.64 и LR- 0.50 и положителната и отрицателната предсказваща стойност % и 86% в разграничаване на пациентите със ЗД II с понижен eGFR. Диагностичната ефективност, с която стойност на pNGAL >121.65 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД II с $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$, е 82 % (Фиг. 10).

pNGAL демонстрира лоша диагностична ефективност в разграничаване на пациентите със ЗД II с албуминурия от тези с нормаалбуминурия (AUC-ROC-0.580). Самостоятелното приложение на pNGAL има достатъчна към лоша диагностична ефективност за откриване на пациенти с ДБЗ сред пациентите със ЗД II с AUC-ROC – 0.619, с оглед на незадоволителната надеждност на маркера не са изведени cut-off стойности.



Фигура 10. ROC крива на pNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД II с понижен eGFR (eGFR <60 mL/min/1.73m²)

4.2. uNGAL и UNC като маркери за диагноза на ДБЗ при пациенти със ЗД II

М

е

д

и Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в трите подгрупи пациенти, разделени впрямо ACR, са: A1 – 19.75 (12.45 – 37.25) ng/mL, A2 – 41.25 (19.02 – 80.87) ng/mL и A3 – 91.30 (14.50 – 149.49) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че концентрацията на uNGAL в отделните пациентски подгрупи и контролната група се различават статистически значимо помежду си ($\chi^2(3) = 47.17$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна за всички сравнения между групите, с изключение между A2 и A3 ($U = 151.00$, $p = 0.022$) и между A1 и контролната група ($U = 846.00$, $p = 0.039$). Пациентите в подгрупа A1 имат статистически значимо по-ниски резултати в A3 (19.75 vs 41.25 ng/mL), $U = 287.00$, $p = 0.007$, $r = -0.335$ и (19.75 vs 91.30 ng/mL), $U = 846.00$, $p = 0.039$. Спрямо контролната група сигнификантно по-високи резултати имат подгрупи A2 и A3 (41.25 vs 14.50 ng/mL), $U = 75.00$, $p < 0.001$, $r = -0.675$ (корекцията на Bonferroni за α при сравнение на 4 групи – статистическата значимост $p \leq 0.008$) (Фиг. 11).

т

е

р

к

в

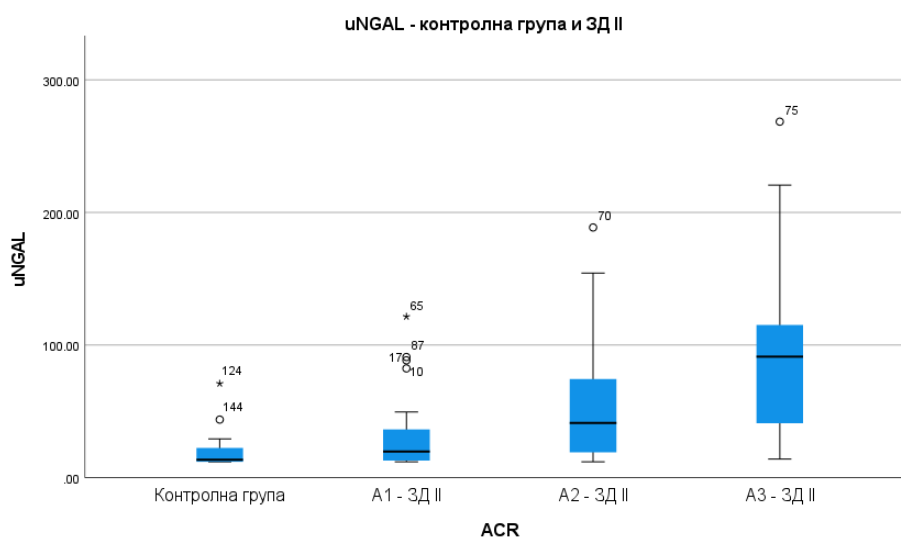
а

р

т

и

л



Фигура 11. Разпределение на резултатите за uNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД II, разделени спрямо ACR

Съотношението UNC има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в

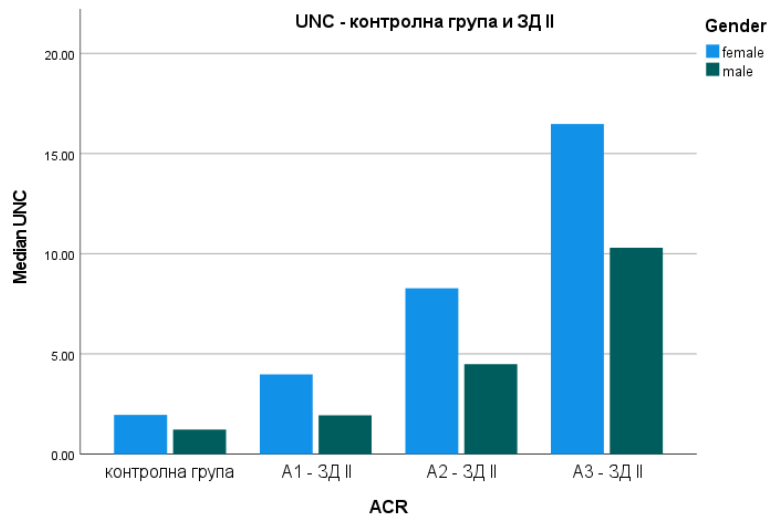
о

т

д

е

лните подгрупи пациенти: A1 – 2.52 (1.83-4.32) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, A2 – 7.86 (4.11-16.46) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и A3 – 10.94 (7.63-33.26) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима разлика в резултатите за UNC между отделните подгрупи пациенти и контролната група ($\chi^2(3)$ всички сравнения между групите, с изключение между A2 и A3 ($U = 148.00$, $p = 0.018$). Пациентите в подгрупа A1 имат статистически значимо по-високи резултати от тези в A2 и A3 високи спрямо контролната група, включително и при A1 (2.52 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 635.0$, p значимост $p \leq 0.008$). Пациентите със ЗД II бяха допълнително разделени и по пол, медианите на UNC при жени в отделните групи са: A1– 3.98 (2.22-5.96) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, A2 – 8.28 (4.48 – 18.11) стойностите на UNC са по-високи при жени в сравнение с мъже, но разликата е сигнификантно значима само в подгрупа A1 ($U=77.00$, $p < 0.001$ $r = -0.525$) и намалява с прогресията на албуминовата екскреция (A2 – $p = 0.119$ и A3 – $p = 426$). Не се установи статистически значима разлика в стойностите на UNC между полово диференцираните подгрупи A2 и A3 (Фиг. 12).



Фигура 12. Медиана на UNC при жени и мъже в контролната група и при пациентите със ЗД II, разделени спрямо ACR.

М

е

д

и

а

н

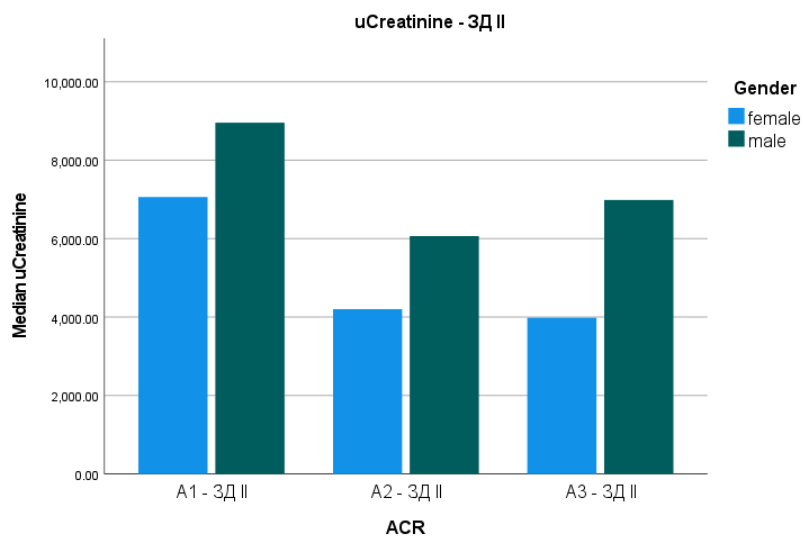
а

т

а

н

а



Фигура 13. Медиана на uCreatinine при жени и мъже при пациентите със ЗД II, разделени спрямо ACR.

г

е

а

т

1

п

и

п

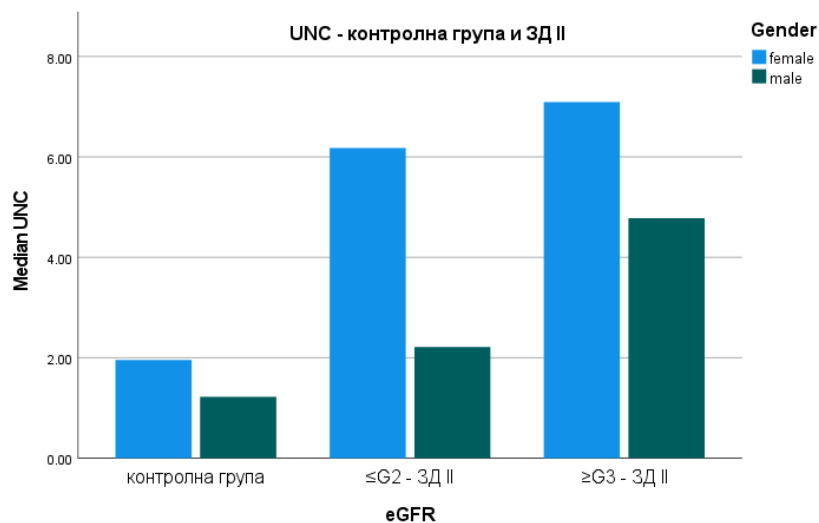
е

п

п

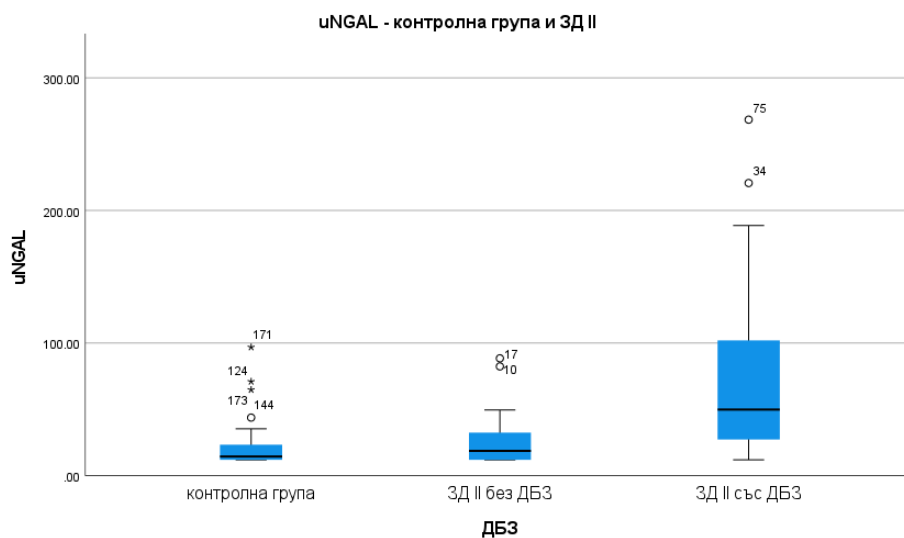
Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо контролната група и пациентските подгрупи ($\chi^2(2)=35.830$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна само спрямо контролната група. Резултатите за uNGAL в пациентските групи $\leq G2$ и $\geq G3$ са статистически значимо по-високи спрямо контролната група (28.45 vs 14.50 ng/mL), $U = 877.0$, $p < 0.001$, $r = -0.383$ и (44.20 vs

Съотношението UNC има медиана и интерквартилен обхват в подгрупа $\leq G2$ – 4.39 (2.03 – установи статистически значима разлика в стойностите на UNC между контролната група и пациентските подгрупи ($\chi^2(2) = 44.894$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна само спрямо контролната група. Резултатите за UNC в пациентските групи $\leq G2$ и $\geq G3$ са статистически значимо по-високи спрямо контролната група (4.39 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 573.0$, $p < 0.001$, $r = -0.546$ и (6.21 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 186.0$, и в $\geq G3$ е 7.09 (4.35 – 17.35) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при мъже в $\leq G2$ е 2.21 (1.80 – 4.94) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и в $\geq G3$ е 4.78 (1.97 – 10.04) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Не се установи статистически значима разлика в стойностите на UNC между полово диференцираните подгрупи $\leq G2$ и $\geq G3$. Стойности на UNC са по-високи при жени в сравнение с мъже във всяка една от подгрупите, но разликата е сигнификантно значима само в подгрупа $\leq G2$ ($U = 215.0$, $p = 0.006$, $r = -0.366$) (Фиг. 14).



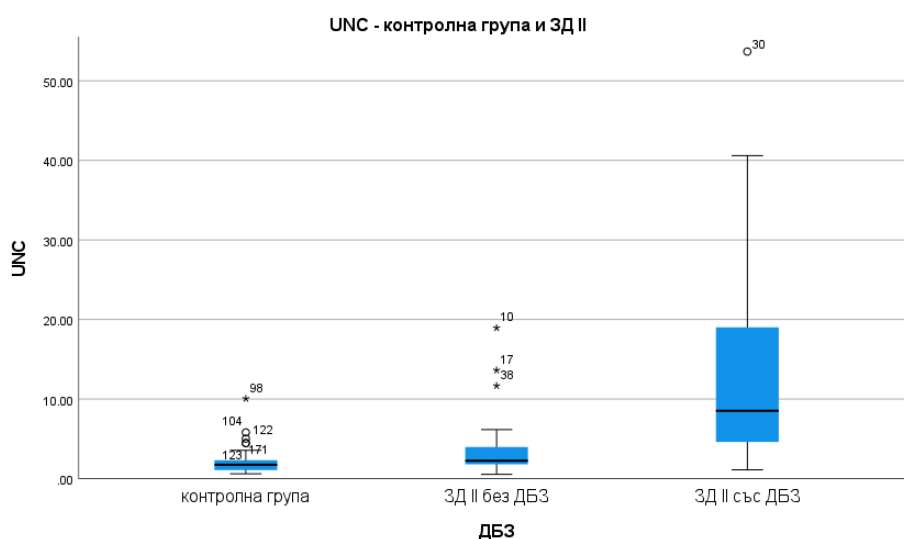
Фигура 14. Медиана на UNC при мъже и жени в контролната група и при пациентите със ЗД II, разделени спрямо eGFR

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL при пациентите със ЗД II с нормална бъбречна функция е 18.70 (12.00 – 33.90) ng/mL и при пациентите с ДБЗ е 49.80 (26.90 – 104.30). Тестът на Kruskal–Wallis установи, че резултатите на uNGAL в отделните пациентски групи и контролната група се различават статистически значимо ($\chi^2(2)=44.25$ $p<0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна между пациентите с ДБЗ и контролната група (49.80 vs 14.50 ng/mL), $U = 418.00$, $p < 0.001$, $r = -0.611$ и между двете пациентски групи (18.70 vs 49.80 ng/mL), $U = 370.00$, $p < 0.001$, $r = -0.484$ (Фиг. 15).



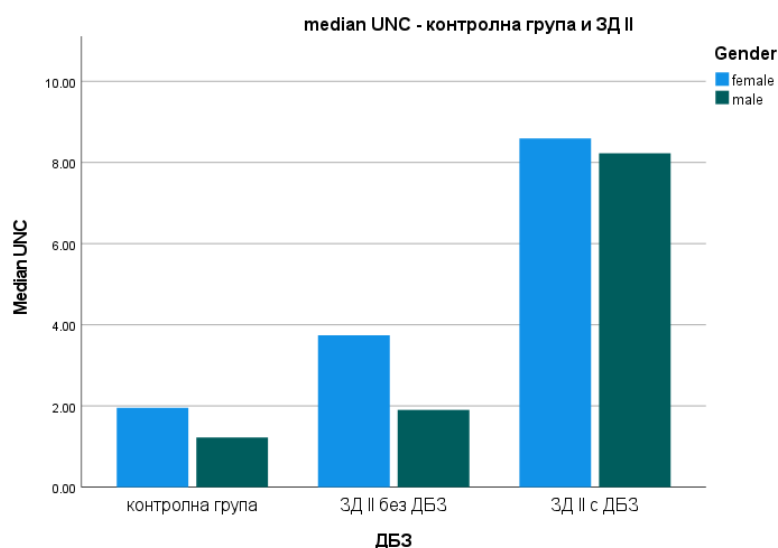
Фигура 15. Разпределение на резултатите за uNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД II без ДБЗ и с ДБЗ

Медианата и интерквартилният обхват на UNC при пациентите със ЗД с нормална бъбречна функция е 2.26 (1.80 – 4.07) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при пациентите с ДБЗ е 8.54 (4.59 – 19.84) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че стойностите на UNC в отделните пациентски подгрупи и контролната група се различават статистически значимо помежду си ($\chi^2(2) = 69.53$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест тази разлика се оказва сигнификантна за всички сравнения между групите: контролната група и ЗД II без ДБЗ (2.26 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U=578.00$, $p = 0.002$, и между двете пациентски групи (2.26 vs 8.54 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 259.00$, $p < 0.001$, $r = -591$ (Фиг.



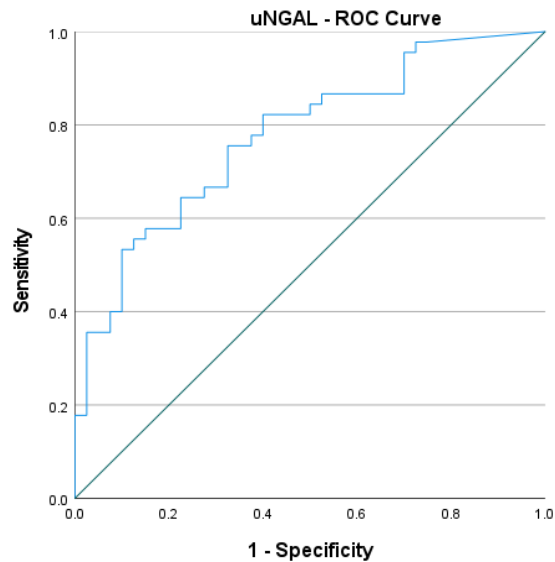
Фигура 16. Разпределение на резултатите за UNC при контролната група и при пациентите със ЗД II без ДБЗ и с ДБЗ

При разделяне по пол медианите на UNC в отделните подгрупи са както следва: при жени – ЗД II без ДБЗ – 3.74 (2.10 – 6.07) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и ЗД II с ДБЗ – 8.59 (4.55 – 19.22) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при мъже – ЗД II без ДБЗ – 1.90 (1.65 – 2.82) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и ЗД II с ДБЗ – 8.22 (4.45 – 20.67) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че концентрацията на UNC в отделните пациентски подгрупи и контролната група се различават статистически значимо помежду си, както при жени ($\chi^2(2) = 39.48$, $p < 0.001$), така и при мъже ($\chi^2(2) = 29.07$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест при жените тази разлика се запази сигнификантна за всички сравнения между групите. При мъжете разликата в стойностите между контролната група и пациентите без ДБЗ не достигна сигнификантна значимост ($U = 136.00$, $p = 0.019$), (корекцията на α при сравнение на 3 групи – статистическата значимост $p \leq 0.017$). Стойностите на UNC са по-високи при жени в сравнение с мъже и в двете подгрупи, но разликата по пол е сигнификантно значима само при пациентите със ЗД без ДБЗ ($U = 60.00$, $p = 0.003$, $r = -0.497$) (Фиг.17).



Фигура 17. Медиана на UNC при жени и мъже в контролната група и при пациентите със ЗД II без ДБЗ и с ДБЗ.

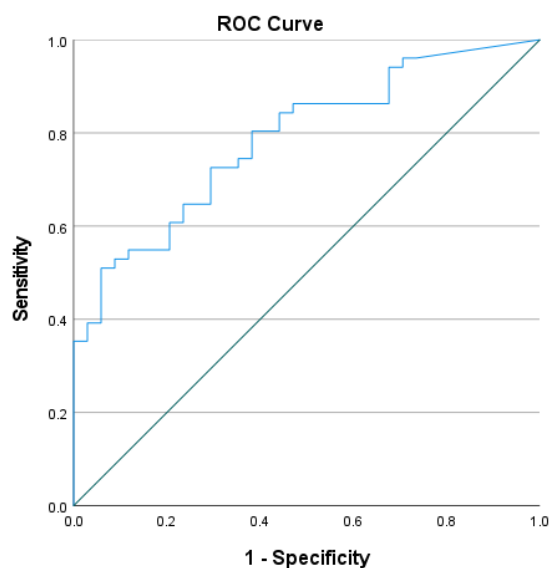
ROC анализът демонстрира добра диагностична ефективност на uNGAL в отдиференциране на пациенти със ЗД II с повишен ACR (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.776. При cut-off – 53.30 ng/mL, стойност над определената горна граница на референтния интервал, маркерът е с диагностична чувствителност и специфичност 47% и 90%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – LR+ 4.67 и LR- 0.59 и положителната и отрицателната предсказваща стойност 84% и 60% в разграничаване на пациентите със ЗД II с повишен ACR. Диагностичната ефективност, с която стойност на pNGAL > 53.30 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД II с ACR > 3.0 g/mol е 67 % (Фиг. 18).



Фигура 18. ROC крива на uNGAL – разграничаване на пациенти със ЗД II с повишен ACR

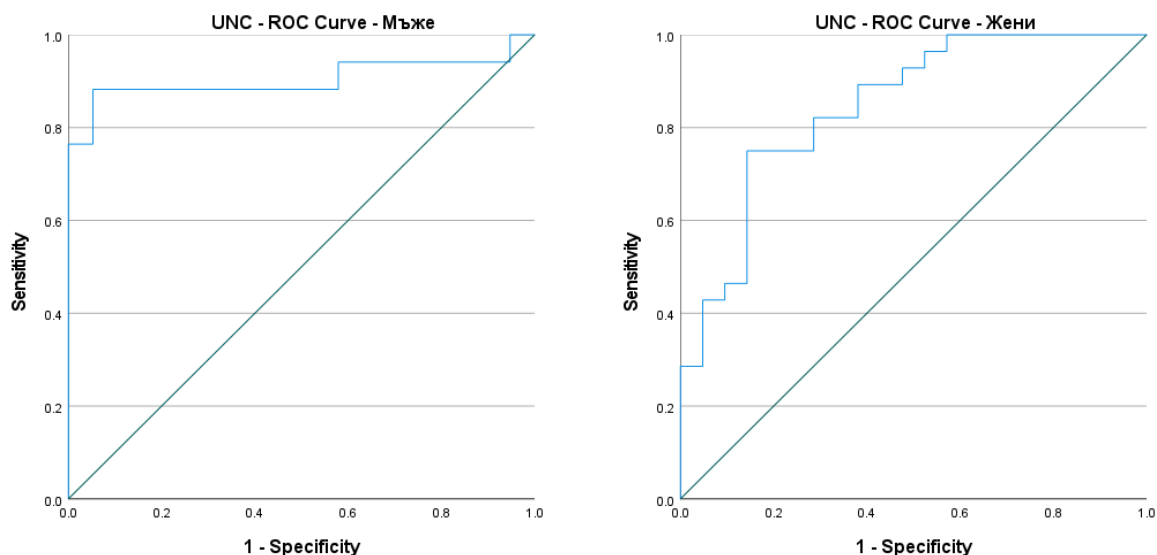
uNGAL има достатъчна диагностична ефективност за откриване на пациенти със ЗД II с намалена гломерулна филтрация ($eGFR < 60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$) с AUC-ROC – 0.646, с оглед на тази незадоволителната надеждност на маркера не са изведени cut-off стойности.

uNGAL има добра диагностична ефективност в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II (ЗД без ДБЗ vs ЗД с ДБЗ) с AUC-ROC – 0.787. При cut-off – 53.30 ng/mL, стойност над определената горна граница на референтния интервал, маркерът е с диагностична чувствителност и специфичност 45% и 94%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – LR+ 7.64 и LR- 0.58 и положителната и отрицателната предсказваща стойност 92% и 53% в разграничаване на пациентите със ЗД II с ДБЗ. Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 53.30 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД II с ДБЗ е 65 % (Фиг. 19).



Фигура 19. ROC крива на uNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД II с ДБЗ

Съотношението UNC показва много добра диагностична точност в отдиференцирането на пациентите със ЗД II с албуминурия (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.876. При cut-off – 4.62 разделяне по пол маркерът UNC демонстрира AUC-ROC при жени – 0.845, и при мъже – 0.904. Изведените полово диференцирани cut-off стойности за UNC в идентифициране пациенти с повишен ACR сред лицата със ЗД II са: при жени – 6.87 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (диагностична чувствителност и специфичност – 75% и 86%) и при мъже – 3.72 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (диагностична чувствителност и специфичност – 88% и 95%). Така определените полово диференцирани cut-off стойности за разграничаване пациенти със ЗД II с повишен ACR имат отношение на положителна и отрицателна вероятност – при жени – LR+ 5.24, и LR- 0.29 и при мъже – LR+ 16.64 и LR- 0.12, положителната и отрицателната предсказваща стойност – при жени 88% и 72% и при мъже – 94% и 90%, и диагностичната ефективност при жени – 80%, и при мъже –

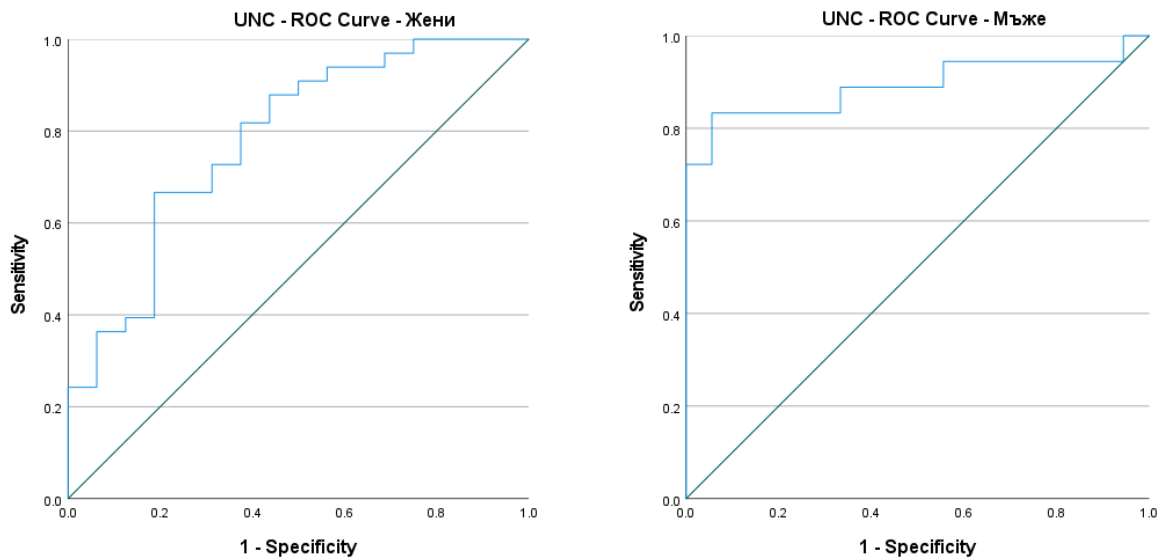


Фигура 20. ROC криви на UNC - жени и при мъже, разграничаващи пациентите със ЗД II с повишен ACR

UNC има много добра диагностична ефективност в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II (ЗД без ДБЗ vs ЗД с ДБЗ) с AUC-ROC – 0.851. При cut-off – 4.62 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, маркерът има диагностична чувствителност 75% и специфичност – 79%. При разделяне по пол лицата с бъбречно увреждане сред пациенти със ЗД II. Изведените полово диференцирани cut-off стойности за ДБЗ на UNC са: при жени – 6.87 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (диагностична чувствителност и специфичност 64% и 81%) и при мъже – 3.72 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (диагностична чувствителност и специфичност 83% и 94%). Така определените полово диференцирани cut-off стойности за ДБЗ имат отношение на положителна и отрицателна вероятност при жени – LR+ 3.38 и LR- 0.44 и

при мъже – LR+ 14.88 и LR- 0.18, положителната и отрицателната предсказваща стойност при жени 88% и 52% и при мъже – 94% и 85%, и диагностичната ефективност при жени – 69 %, и при мъже – 89 % (Фиг. 21).

UNC демонстрира лоша диагностична ефективност в идентифициране на пациентите със ЗД II с намалена гломерулна филтрация ($eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$) (AUC-ROC – 0.578) и не са определени cut-off стойности.



Фигура 21. ROC криви. UNC жени и мъже, разграничаващи лица със ЗД II с ДБЗ

Статистическата обработка на данните показва, че $pNGAL$ е подходящ маркер за отдиференциране на пациентите със ЗД II с намалена гломерулна филтрация, докато $uNGAL$ и UNC за идентифициране на тези с повишен ACR и за откриване на пациентите със ЗД II с ДБЗ. UNC показва по-добра диагностична надеждност от $uNGAL$ в разграничаване на пациентите със ЗД II с албуминурия и с ДБЗ (Табл. 19).

Таблица 19. Cut-off стойности при пациенти със ЗД II изведени в настоящото проучване

Показател	Критерий			ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС
	3 g/mol и/или								
UNC - жени									
UNC - мъже									
UNC - жени	3 g/mol и/или $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$								
UNC - мъже	3 g/mol и/или								

Съкращения: ИП – истинско положителни, ИО – истинско отрицателни, ФП – фалшиво положителни, ФО – фалшиво отрицателни, ДЧ – диагностична чувствителност, ДС – диагностична специфичност

От така изведените данни може да се обобщи, че UNC показва по-добра диагностична ефективност от uNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД II с бъбречно увреждане. Ето защо е предпочетен при оценка ролята на комбинираното приложение на два маркера - pNGAL и UNC. За да се определи значението на pNGAL и UNC за поставяне на диагнозата на ДБЗ при пациенти със ЗД II, дефинирано като $ACR > 3\text{g/mol}$ и/или $eGFR < 60\text{mL/min/1.73m}^2$, е проведен логистичен регресионен анализ. Когато и двата маркера се отчитат едновременно, те значимо прогнозира наличието на ДБЗ – $\chi^2 = 20.405$, $df = 2$, $p < 0.01$, но независимата променлива pNGAL ($p = 0.503$) не допринася статистически значимо и е изключена. Редуцираният регресионен модел, в който е включен само UNC, е статистически значим и съществено прогнозира наличието на ДБЗ – $\chi^2 = 27.575$, $df = 1$, $p < 0.001$. Моделът обяснява между 28% (Cox & Snell R^2) и 38% (Nadelkerkes R^2) от дисперсията и коректно диагностицира 78% от пациентите със ЗД II спрямо наличието на бъбречно увреждане (79% от пациентите без ДБЗ и 75% от пациентите с ДБЗ). Експонентата на регресионния коефициент $\text{Exp}(B)$ демонстрира, че повишението на UNC с $1 \mu\text{g}/\text{mmol}$ увеличава шанса пациент със ЗД II да има ДБЗ с 1.29 пъти. След разделяне по пол и повторение на анализа се установи, че регресионният модел е също статистически значим и независим от pNGAL, като UNC значимо прогнозира наличието на ДБЗ сред пациентите със ЗД II (жени – $\chi^2=9.017$, $df = 1$, $p = 0.003$, и мъже – $\chi^2 = 23.788$, $df = 1$, поставяне на диагноза ДБЗ сред пациентите със ЗД II не е статистически значим ($p = 0.121$), а

т
о
з

и Оценено е доколко така определената cut-off стойност на pNGAL като маркер за намалена кломерулна филтрация може да подобри диагностичната ефективност на полово диференцираните cut-off стойността на UNC за ДБЗ. Когато и двете cut-off стойности се прилагат едновременно за откриване на ДБЗ, те показват диагностичната чувствителност и специфичност – 89% и 73%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – $LR+ 3.35$ и $LR- 0.15$ и положителната и отрицателната предсказваща стойност – 84% и 81%. Моделът, при който се прилагат едновременно cut-off стойностите $pNGAL > 121.65$ и/или UNC при жени и при мъже $> 3.72 \mu\text{g}/\text{mmol}$, има диагностична ефективност в идентифициране пациенти със ЗД II с ДБЗ 83% (vs 78% – обща диагностична ефективност на UNC). От така изведените данни може да се обобщи, че pNGAL подобрява, но не и сигнификантно, прогностичната стойност на UNC за откриване на пациенти с ДБЗ сред лицата със ЗД II.

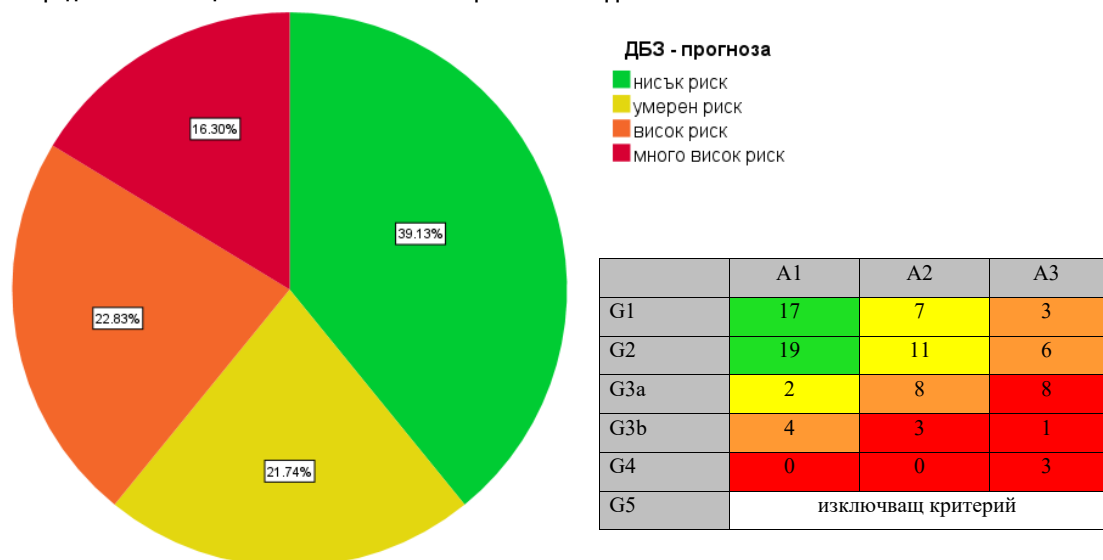
л
з
в
а

с

5. Диагностична надеждност на NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ при ЗД II.

Съгласно насоките на KDIGO 2020, пациентите със ЗД II са класифицирани според тежестта и прогнозата на ДБЗ, спрямо стойностите на ACR и eGFR. Пациентите са висок риск – 21 (22.8%) и с много висок риск – 15 (16.3%) пациенти (Фиг. 22).

Разпределение на пациентите в зависимост от прогнозата на ДБЗ



Фигура 22. Разпределение на пациентите в зависимост от наличието и прогнозата на ДБЗ

Тъй като лошият гликемичен контрол е основен фактор в развитието и прогресията на ДБЗ, е оценена връзката му с нивата на NGAL в плазма и урина. В зависимост от гликемичния контрол, резултатите на пациентите са разделени в две подгрупи, като дефинираната разграничаваща стойност е HbA1c – 7.5%. Характеристиката на пациентите в групите, разделени спрямо наличието и прогнозата на ДБЗ, е представена на Таблица 20 (Табл. 20).

Таблица 20. Характеристика на групите пациенти със ЗД II

Категория	Критерий		N (жени:мъже)	Възраст
нисък риск		1	36 (16:20)	5
		.		6
умерен риск		1	20 (16:4)	5
		0		2
висок риск		4	21 (12:9)	6
		7		2
много висок риск				6
				1
добър контрол	HbA1c ≤ 7.5 %			6
				1
лош контрол				5
				4

pNGAL има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти, разделени в зависимост от прогнозата на ДБЗ: нисък риск – 70.45 (53.42 – 93.80) ng/mL, умерен риск – 75.55 (51.60 – 92.65) ng/mL, висок риск – 114.65 (62.40 – 165.58) ng/mL и много висок риск – 121.80 (74.80 – 191.15) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между отделните подгрупи

п

а

ц

и Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо епрямо гликемичния контрол, не се различават сигнификантно помежду ($\chi^2(2) = 3.547$, $p =$ идентифициране на пациентите със ЗД II с лош гликемичен контрол (AUC-ROC – 0.488).

т

и

(С цел да се изследва асоциацията между стойностите на pNGAL и изследваните показатели за бъбречно увреждане и за контрол на ЗД, е използван коефициентът на ранговата корелация Spearman Rho. Корелационният анализ показва статистически значима положителна корелация между pNGAL с концентрацията на урея и креатинин в плазма ($\rho = 0.483$, $p < 0.001$) и отрицателна корелация между pNGAL с eGFR ($\rho = -0.460$, $p < 0.001$). Не се установи сигнификантна корелация между pNGAL с ACR, както и с маркерите за метаболитен и гликемичен контрол (Табл. 21).

=

Таблица 21. Корелационна зависимост на pNGAL (Spearman’s rho)

		UN	Creat	eGFR	Chol	TG	HDL	LDL	HbA1c	ACR	uNGAL	UNC
pNGAL	rho	0.483	0.477	-0.460	-0.109	-0.010	-0.150	-0.118	-0.206	0.188	0.202	0.128
	p	<	<	<	0.364	0.935	0.219	0.334	0.109	0.116	0.106	0.311

статистически значима корелация $p < 0.001$

има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти, разделени в зависимост от прогнозата на ДБЗ: нисък риск – 18.70 (12.00 – 33.90) ng/mL, умерен риск – 36.50 (24.70 – 62.65) ng/mL, висок риск – 47.00 (15.22 – 102.15) ng/mL и много висок риск – 99.80 (30.20 – 135.20) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима

β

а

з

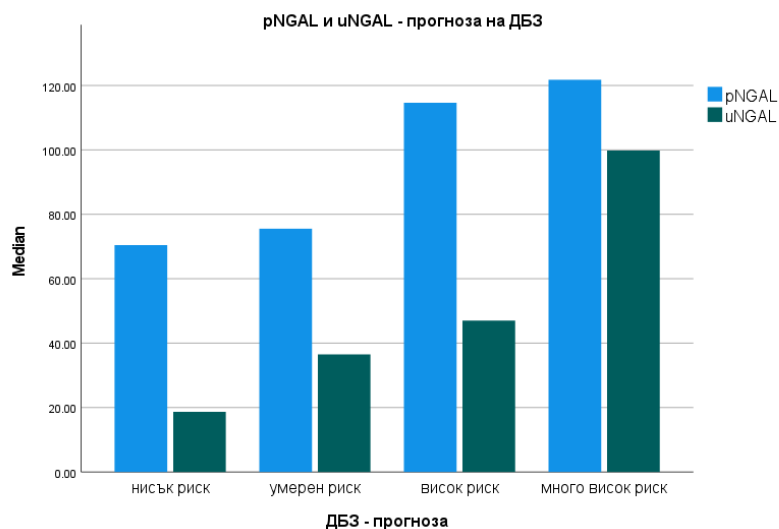
л

θ

к

θ

з



Фигура 23. Медиана на pNGAL и uNGAL при пациентите със ЗД II, разделени в зависимост от наличието и прогнозата на ДБЗ

има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти,

р

а

з

д

е

л

е

н

и

в

з

а

в

и

с

и

м

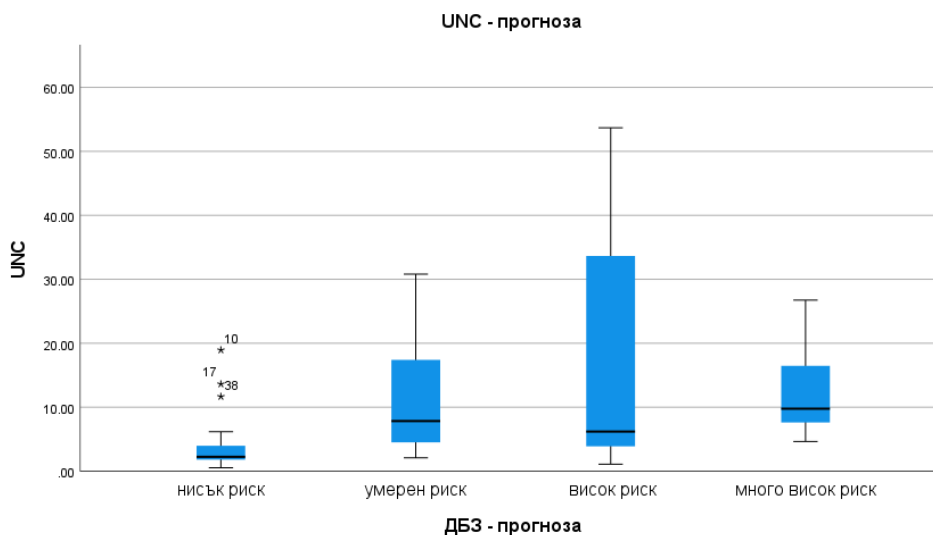
о

с

т

о

т



Фигура 24. Разпределение на резултатите за UNC при пациентите със ЗД II, разделени в зависимост от наличието и прогнозата на ДБЗ

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо подгрупите пациенти ($p=0.861$), но резултатите на uNGAL във всяка една подгрупа са

сигнификантно по-високи спрямо контролната група (добър контрол – $U = 262.0$, $p < 0.001$, $r = -0.385$ и лош контрол – $U = 716.0$, $p < 0.001$, $r = -0.423$). uNGAL демонстрира лоша диагностична ефективност в идентифициране на пациентите със ЗД II с лош гликемичен контрол с AUC-ROC – 0.514.

Съотношението UNC има медиана и интерквартилен обхват в подгрупа с добър гликемичен отделните подгрупи пациенти ($p = 0.452$), но резултатите за UNC във всяка една подгрупа са сигнификантно по-високи спрямо контролната група (добър контрол – $U = 202.0$, $p < 0.001$, $r = -0.464$ и лош контрол – $U = 475.0$, $p < 0.001$, $r = -0.570$). UNC демонстрира лоша диагностична ефективност в идентифициране на пациентите със ЗД II с лош гликемичен контрол с AUC-ROC – 0.559.

Корелационният анализ на Spearman Rho показва статистически значима положителна корелация между uNGAL с концентрацията на албумин в урината (AER) ($\rho = 0.610$, $p < 0.001$) и ACR ($\rho = 0.514$, $p < 0.001$) и отрицателна корелация между uNGAL и eGFR ($\rho = -0.232$, $p = 0.033$). Не се установи сигнификантна корелация между uNGAL и маркерите за метаболитен и гликемичен контрол на ЗД. Съотношението UNC корелира значимо положително с AER (ρ с eGFR ($\rho = -0.265$, $p = 0.014$). Не се установи сигнификантна корелация между UNC и маркерите оценяващи липидния статус (Табл. 22).

Таблица 22. Корелационна зависимост на uNGAL и UNC (Spearman’s rho)

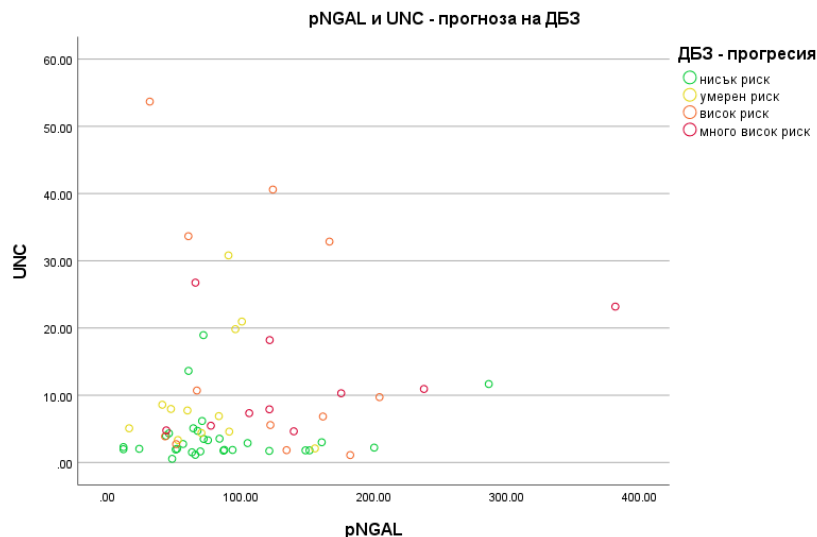
		AER	ACR	eGFR	HbA1c	UN	Creat	Chol	TG	HDL	LDL	pNGAL
uNGAL	rho	0.610	0.514	-0.232	0.060	0.056	0.160	0.112	0.026	0.072	0.024	0.202
	p	<0.001**	<0.001**	0.033*	0.624	0.616	0.144	0.318	0.816	0.529	0.833	0.106
UNC	rho	0.492	0.692	-0.265	0.238	0.103	0.138	0.084	0.084	-0.037	-0.067	0.128
	p	<0.001**	<0.001**	0.014*	0.049	0.349	0.207	0.458	0.455	0.745	0.562	0.311

статистически значима корелация $p < 0.05$

статистически значима корелация $p < 0.05$

За да се оцени прогностичната стойност на маркерите pNGAL и UNC в класифицирането на пациентите според тежестта и прогнозата на ДБЗ, е проведен дискриминантен анализ. Анализът констатира, че едновременното използване на двата маркера има по-добра прогностична стойност от използването им самостоятелно, като и двата маркера са статистически значимо свързани с разпределението на пациентите по групи. Моделът, използващ pNGAL и UNC, е способен статистически значимо да дискриминира групи с ДБЗ – $\lambda = 0.665$, $\chi^2 = 24.904$, $p < 0.001$, $\eta = 0.36$ и обяснява 26.8% от разпределението на пациентите със

ЗД по тежест и прогноза на бъбречното увреждане. Дискриминантната функция е: $D = -1.43 +$ пациентите със ЗД II в съответните групи спрямо степента на бъбречно. Моделът, който използва само pNGAL uNGAL или само UNC, прогнозира успешно разпределението съответно на 26%, 42.4% и 49% от пациентите спрямо тежестта и прогнозата на ДБЗ (Фиг. 25).

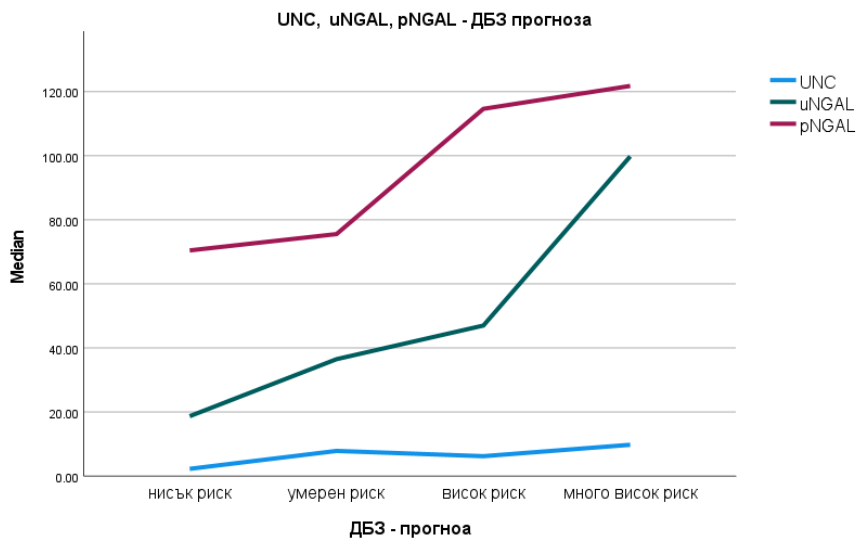


Фигура 25. Разпределение на резултатите за pNGAL и UNC при пациентите със ЗД II, разделени в зависимост от наличието и прогнозата на ДБЗ

За да се оцени вероятността, с която pNGAL и UNC могат успешно да прогнозират наличието на ДБЗ с висок и много висок риск сред пациентите със ЗД II, е проведен логистичен регресионен анализ. Пациентите са разпределени в две групи: първа група с нисък и умерен риск и втора група с висок и много висок риск. Регресионен модел, в който е включен pNGAL и UNC, е статистически значим и съществено прогнозира наличието на ДБЗ с висок и много висок риск – $\chi^2 = 18.558$, $df = 2$, $p < 0.01$, като и двата маркера допринасят статистически значимо за правилното разпределение на пациентите в двете групи. Моделът обяснява между 25% (Cox & Snell R^2) и 34% (Nadelkerkes R^2) от дисперсията и коректно класифицира 75% от пациентите със ЗД II към така дефинираните групи – 91% от пациентите в групата с нисък/умерен риск и 48% от пациентите в групата висок/много висок риск. Експонентата на регресионния коефициент $\text{Exp}(B)$ демонстрира, че повишението на pNGAL с 1 ng/mL увеличава шанса пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск с 1.01 пъти, а повишението на UNC с $1 \text{ } \mu\text{g}/\text{mmol}$ увеличава вероятността пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск с 1.09 пъти (жени – 1.07 пъти, мъже – 1.14 пъти). Моделът, който използва само pNGAL или само UNC коректно класифицира съответно на 66% и 65% от пациентите към групите с нисък/умерен риск и висок/много висок риск.

От така изведените данни може да се обобщи, че при едновременното използване на двата

маркера pNGAL и UNC се постига по-коректна оценка на прогнозата на ДБЗ, отколкото при прилагането им самостоятелно (Фиг. 26).



Фигура 26. Промяна в медианата на UNC, uNGAL и pNGAL в прогресията на ДБЗ

Седем от насочените пациенти със ЗД II не отговарят на включващите критерии – при 5-ма е констатирана сигнификантна левкоцитурия (\bar{x} - pNGAL = 79.06 ng/mL, uNGAL = 248.76

и

U
N
C

=

4
7

.

8

7

За

критерии

7

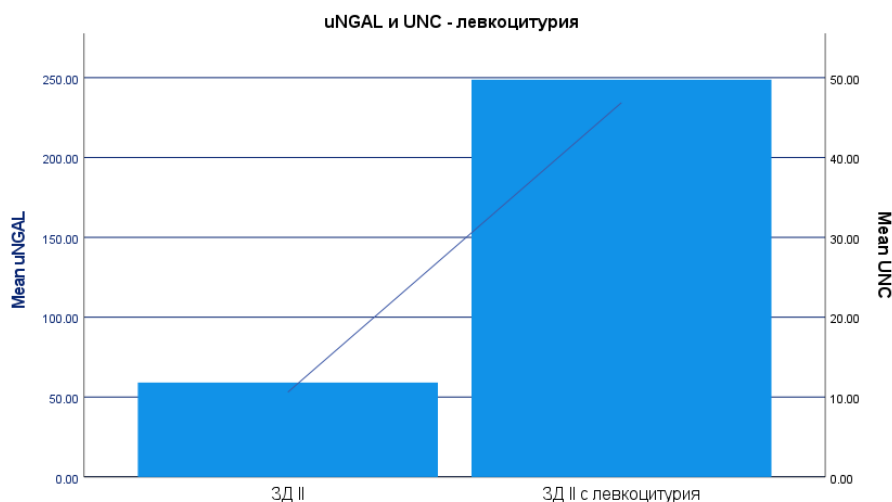
5

п

р

и

ц



Фигура 27. Mean - uNGAL и UNC при пациенти със ЗД II без и със левкоцитурия

6. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ при ЗД I

За участие в проучването са насочени 78 деца със ЗД I, но при 3 от тях са констатирани критерии за изключване от групата. Лицата със ЗД I, отговарящи на включващите критерии са

7

5

п

р

и

ц

Таблица 23. Характеристика на пациентската група със ЗД I

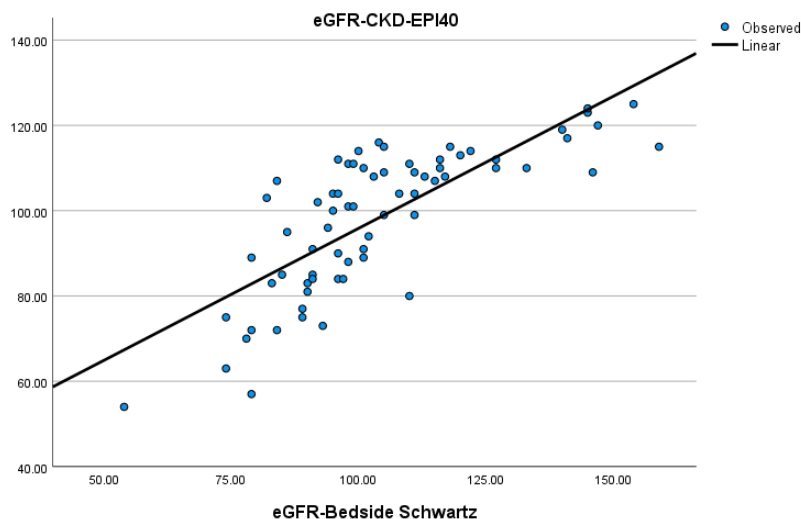
Показател	Пациенти ЗД I n	К	p
брой	75	42	
пол момичета:момчета (%)	44%:56 %	50%:50%	= 0.536
години (год.)	13.39 ± 2.82	1	= 0.181
глюкоза (mmol/L)	1	4	< 0.001
урейя (mmol/L)	4	3	= 0.006
к	5	5	= 0.413
е	1	*	*
е	9	9	= 0.318
общ холестерол (mmol/L)	4	4	= 0.420
триглицериди (mmol/L)	1	0	= 0.364
HDL-холестерол (mmol/L)	1	*	*
LDL-холестерол (mmol/L)	2	*	*
AER (mg/l)	3	*	*
HbA1c (%)	8	*	*
ACR (g/mol)	4	*	*
BMI	2	*	*
BMI _(пациент) /BMI _(прицелна за възрастта)	1	*	*
продължителност на диабета	7	*	*
pNGAL (ng/mL)	6	6	
uNGAL (ng/mL)	4	19.96 ± 13.93 / 13.70 (10.35)	
UNC (µg/mmol)		1.72 ± 0.90 / 1.47 (1.06)	

В тази пациентска кохорта се констатира ACR > 30 g/mol при 2 от включените деца. Ето защо пациентските резултати са разделени само в две подгрупи: A1 – при ACR < 3 g/mol, A2 при ACR – 3 – 30 g/mol, като подгрупа A3 не е формирана. Понижение на eGFR < 60 /min/1.73m² е установено само при един от включените пациенти. Ето защо е оценена ролята на pNGAL в диагностиката на гломерулната хиперфилтрация като пациентската кохорта е разделена на две подгрупи според стойностите на eGFR_(Bedside Schwartz) и според eGFR_(CKD-EPI40), с гранична стойност – 90 mL/min/1.73m². В зависимост от гликемичния контрол, резултатите на децата със ЗД I са разделени в две подгрупи, като дефинираната разграничаваща стойност е HbA1c – 7.5%. Тъй като само при един пациент е констатирано понижение на eGFR < 60 /min/1.73m², който е и с патологична албуминурия, то е излишно формиране на групи – ЗД I без ДБЗ и ЗД I с ДБЗ, тъй като те са идентични с A1 и A2. Cut-off стойностите, изведени в настоящото проучване за идентифициране на патологична албуминурия при пациенти със ЗД съответстват на cut-off стойности за ДБЗ. Характеристиките на пациентските подгрупи е представена на таблица 24 (Табл. 24).

Таблица 24. Характеристика на подгрупите пациенти със ЗД I

Категория	Критерий		N(%)	Години
A1				1
A2	ACR – 3 – 30 g/mol			1
A3(не е формирана)				1
≥ 90	≥ 90 mL/min/1.73m ²			1
				1
≥ 90	≥ 90 mL/min/1.73m ²			1
				1
добър контрол	HbA1c ≤ 7.5 %			1
лош контрол				1

eGFR при пациентите със ЗД I е изчислен с утвърдената формула Bedside Schwartz – и алтернативната формула СКD-EPI40 - eGFR_(СКD-EPI40). С цел да се установи линейната регресия между СКD-EPI40 и формула Bedside Schwartz е проведен единичен регресионен анализ, който показва че eGFR_(Bedside Schwartz) значимо може да прогнозира eGFR_(СКD-EPI40), F(1.75) 0.001. Регресионната константа ($\alpha = 33.97$, $p < 0.001$) и регресионният коефициент ($b = 0.613$, са статистически значими. Намереното уравнение за връзката между резултатите от двете формули е: $eGFR_{(СКD-EPI40)} = 33.97 + 0.613 \times eGFR_{(Bedside Schwartz)}$. Стойността на коригирания коефициент на детерминация (adjusted R²) е 0.592, което показва, че 59% от измененията в могат да се обяснят от представения регресионен модел, т. е. от eGFR_(Bedside Schwartz). Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е много по-голяма от типичната големина на ефекта (Фиг. 28).



Ф

Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите за pNGAL, uNGAL и ENC в цялата кохортата пациенти със ЗД I и в отделните подгрупи показва липса на Гаусово разпределение. Тестът на Shapiro–Wilk’s ($p < 0.05$) демонстрира коефициенти за асиметрия и эксцес със z-value > 1.96 , което отхвърля нулевата хипотеза за нормално разпределение и за всички показатели във всяка една от обследваните подгрупи. Последващата статистическа обработка на данните е извършена с непараметрични методи за анализ.

2

6.1. pNGAL като маркер за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД I

8

М

е

д

р

и

е

а

н

а

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо ≥ 90 , но разликата не достига сигнификантна значимост ($U = 288.5$, $p = 0.110$). При прилагане на алтернативната формула $eGFR_{(CKD-EPI40)}$ за класифициране на пациентските резултати, се установи медиана на pNGAL в групата с $eGFR_{(CKD-EPI40)} \geq 90$ – 53.95 (41.63 – 67.30) ng/mL и в групата с $eGFR_{(CKD-EPI40)} < 90$ – 77.10 (53.90 – 111.60) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че концентрацията на pNGAL в така дефинираните подгрупи пациенти и контролната група се различават статистически значимо помежду си ($\chi^2(2) = 10.082$, $p = 0.006$). След приложение на

т

е

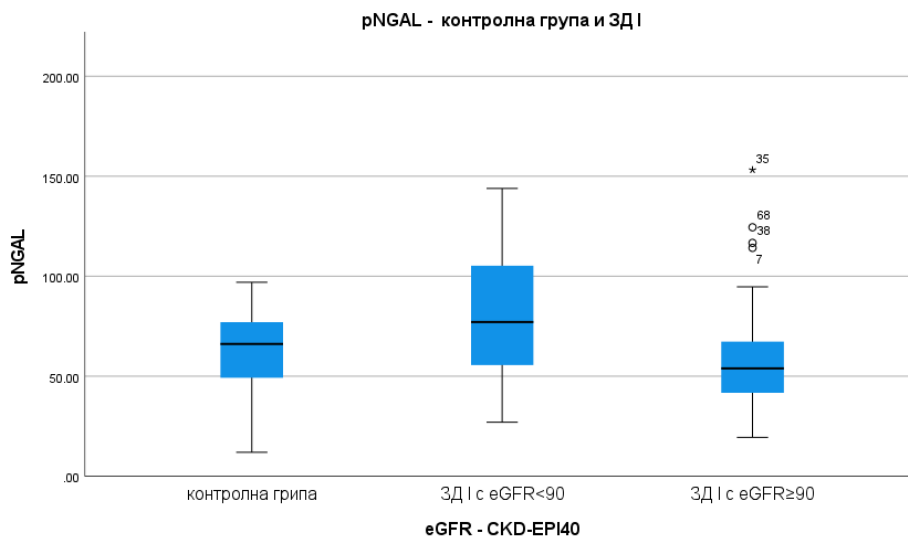
р

к

в

а

post-hoc тест, тази разлика се оказа сигнификантна само между двете пациентски подгрупи



Фигура 29. Разпределение на резултатите за pNGAL при контролната група и при

П

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо HbA1c, са: добър контрол – 59.00 (50.7 – 93.9) ng/mL, и с лош контрол – 54.90 (41.5 – 77.1) ng/mL.

Стойностите на pNGAL между отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо гликемичния контрол, не се различават сигнификантно както помежду си така и спрямо контролната група ($\chi^2(2) = 0.716, p = 0.699$).

Т Корелационният анализ на Spearman Rho показва статистически значима отрицателна корелация между pNGAL и eGFR_(CKD-EPI40) ($\rho = -0.324, p = 0.006$), но не и с eGFR_(Bedside Schwartz). Не се установи сигнификантна корелация между pNGAL и ACR, както и с маркерите за метаболитен и гликемичен контрол и с продължителността на ЗД I (Табл.25).

Таблица 25. Корелационна зависимост на pNGAL (Spearman's rho)

С	Б	eGFR		Urea	Creat	Chol	TG	HDL	LDL	BMI	HbA1c	ACR	
		CKDEPI											
С	рNGAL	rho	-0.324	-0.197	-0.214	0.221	-0.047	-0.173	0.118	0.021	0.116	-0.148	-0.180
		p	=0.006*	=0.110	0.076	=0.064	=0.698	=0.152	=0.330	=0.864	=0.354	=0.228	=0.136

Статистически значима корелация $p < 0.05$

Д ROC анализът демонстрира добра диагностична ефективност на pNGAL в отиференциране на пациенти ЗД I с eGFR_(CKD-EPI40) < 90mL/min/1.73m², с AUC-ROC– 0.713.

При cut-off 96.80 ng/mL, pNGAL има диагностична чувствителност и специфичност 30% и и отрицателна предсказваща стойност – 64% и 73% и диагностична ефективност 72% в

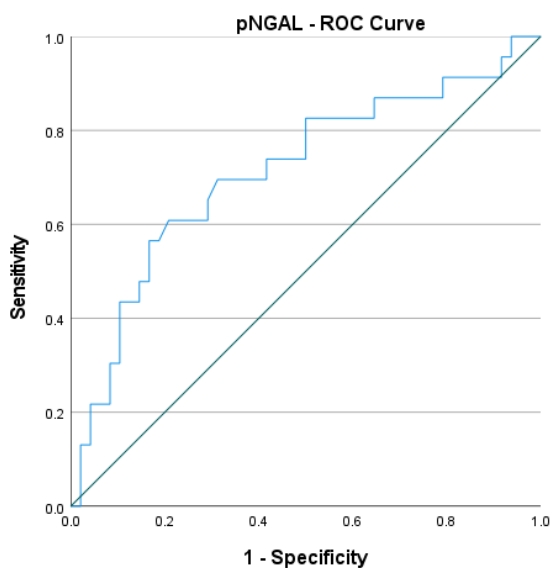
р

а

з

п

разграничаването на пациентите със ЗД I с леко понижена гломерулна филтрация (Фиг. 30).

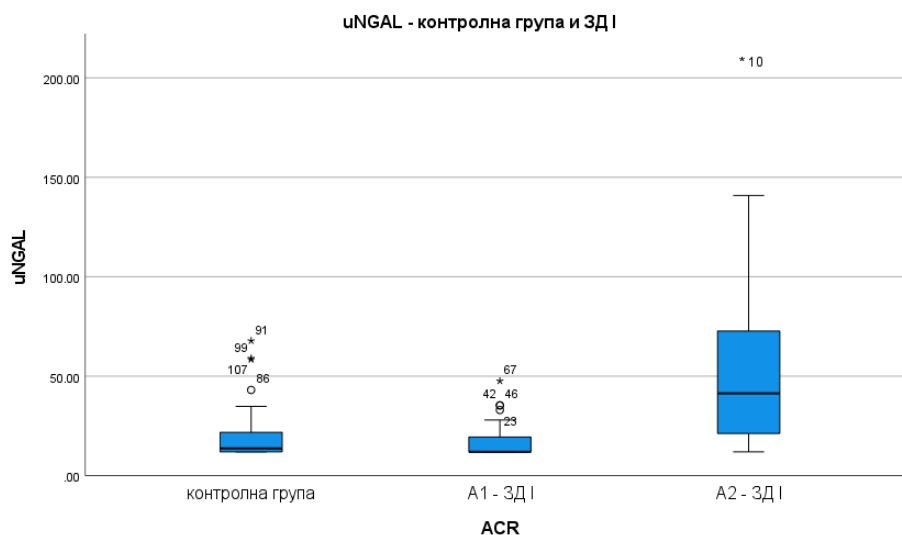


Фигура 30. ROC крива на pNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД I с eGFR < 90 mL/min/1.73m²

6.2. uNGAL и UNC като маркери за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД I

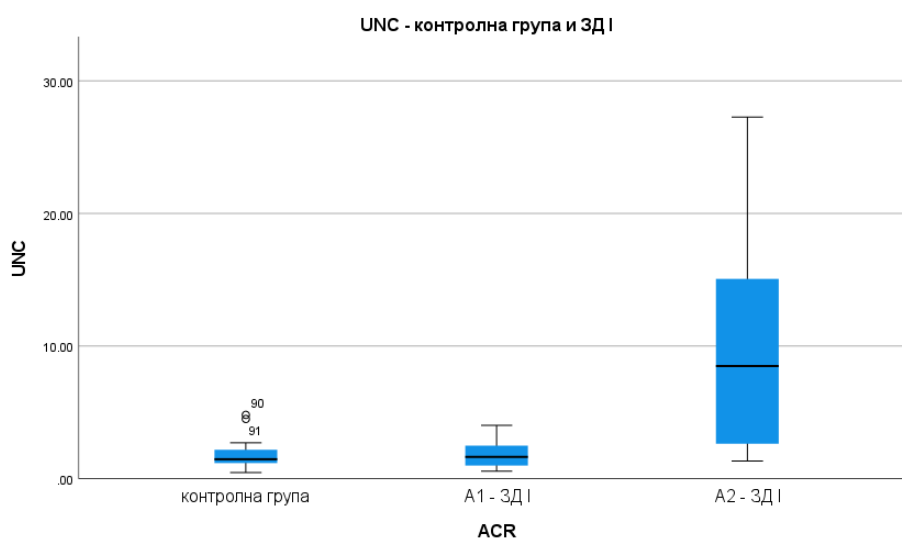
Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL и UNC в цялата пациентска група са 13.00 (12.00 – 27.00) ng/mL и 1.94 (1.18 – 3.32) µg/mmol. Не се установи сигнификантна разлика в концентрацията на uNGAL между пациентите със ЗД I и контролната група (U = 1431, p = 0.022). Резултатите за UNC са статистически значимо по-високи при пациентите със ЗД I спрямо контролната група (1.94 vs 1.47 µg/mmol) U=1107.5, p=0.022, r = -0.22.

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо са: A1 – 12.00 (12.00 – 19.57) ng/mL и A2 – 41.4 (17.60 – 83.70) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че стойностите на uNGAL в контролната група и в отделните подгрупи, разделени спрямо ACR, се различават значимо помежду си ($\chi^2(2) = 20.12$, p < 0.001). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна за всички сравнения между групите с изключение между A1 и контролната група. Тестът на Mann–Whitney установи статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между отделните подгрупи пациенти със ЗД I (12.00 vs 41.4 ng/mL), U=179.0, p < 0.001, r = -0.517. Спрямо контролната група сигнификантно по-високи резултати имат само пациентите от подгрупа A2 (41.4 vs 13.00 ng/mL) (Фиг. 31).



Фигура 31. Разпределение на резултатите за uNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД I, разделени спрямо ACR

Съотношението UNC има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти: A1 – 1.64 (0.98 – 2.54) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, и A2 – 8.49 (2.50 – 15.32) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че стойностите на UNC в контролната група и в отделните подгрупи, разделени спрямо ACR, се различават значимо помежду си ($\chi^2(2) = 26.35$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказа сигнификантна за всички сравнения между групите с изключение между A1 и контролната група. Тестът на Mann–Whitney установи статистически значима разлика в стойностите на UNC между двете пациентски подгрупи (1.64 vs 8.49 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 139.0$, $p < 0.001$, $r = -0.547$. Спрямо контролната група сигнификантно по-високи резултати имат единствено пациентите в A2 (8.49 vs 1.47 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), (Фиг. 32).



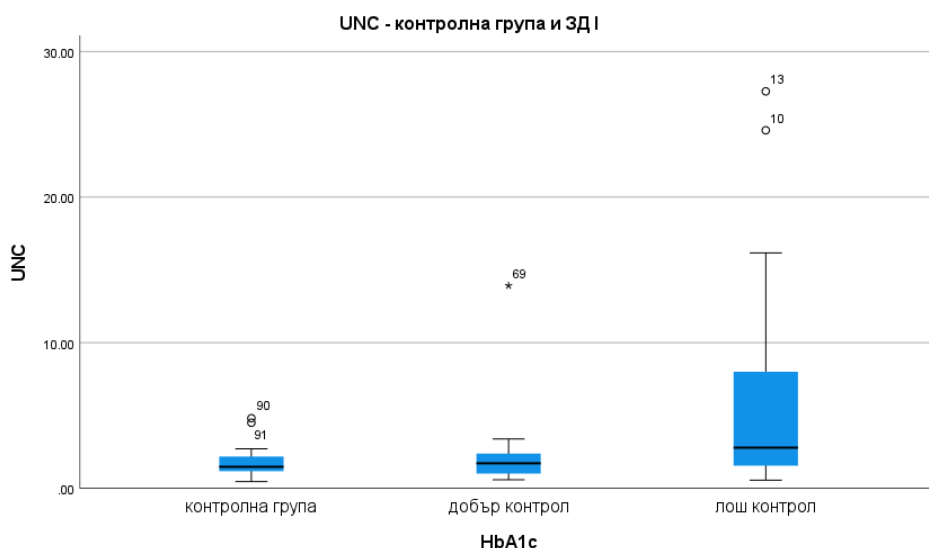
Фигура 32. Разпределение на резултатите за UNC при контролната група и при пациентите със ЗД I, разделени спрямо ACR

Не се установи статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между контролната група и отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо eGFR_(Bedside Schwartz) ($\chi^2(2)$), както и спрямо eGFR_(CKD-EPI40) ($\chi^2(2) = 2.115$, $p = 0.347$). Тестът на Kruskal–Wallis установи, че стойностите на UNC в контролната група и в отделните подгрупи, разделени спрямо eGFR_(CKD-EPI40), се различават помежду си, но след приложение на post-hoc тест тази разлика не достигна статистическа значимост за всяко едно сравнение (корекцията на Bonferroni за α при сравнение на 3 групи – статистическата значимост $p \leq 0.017$).

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в двете подгрупи пациенти, разделени спрямо HbA1c, са: добър контрол – 12.00 (12.00 – 20.90) ng/mL, и с лош контрол – 16.10 (12.00 – 39.90) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis не установи статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между контролната група и отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо HbA1c ($\chi^2(2) = 4.661$, $p = 0.097$).

С

Ъ
О
Т
Н
О
Ш
Е
Н
И
Е
Т
О
У
Н
С



Фигура 33. Разпределение на резултатите за UNC при контролната група и при пациентите със ЗД I, разделени спрямо HbA1c

а
м
е
д

Корелационният анализ на Spearman показва статистически значима положителна корелация между uNGAL с AER ($\rho = 0.408$, $p < 0.001$), ACR ($\rho = 0.389$, $p < 0.001$), HbA1c ($\rho = 0.255$, $p = 0.031$), BMI ($\rho = 0.273$, $p = 0.025$), триглицериди ($\rho = 0.262$, $p = 0.027$) и възраст ($\rho = 0.250$, $p = 0.033$). UNC корелира положително сигнификантно с ACR ($\rho = 0.641$, $p < 0.001$), AER ($\rho = 0.250$, $p = 0.033$), HbA1c ($\rho = 0.435$, $p < 0.001$) и триглицериди ($p < 0.001$). Не се констатира значима корелация както на uNGAL, така и на UNC с eGFR_(Bedside) и eGFR_(СКД-ЕР140), както и с продължителността на ЗД I (Табл.26).

Таблица 26. Корелационна зависимост на uNGAL и UNC (Spearman's rho)

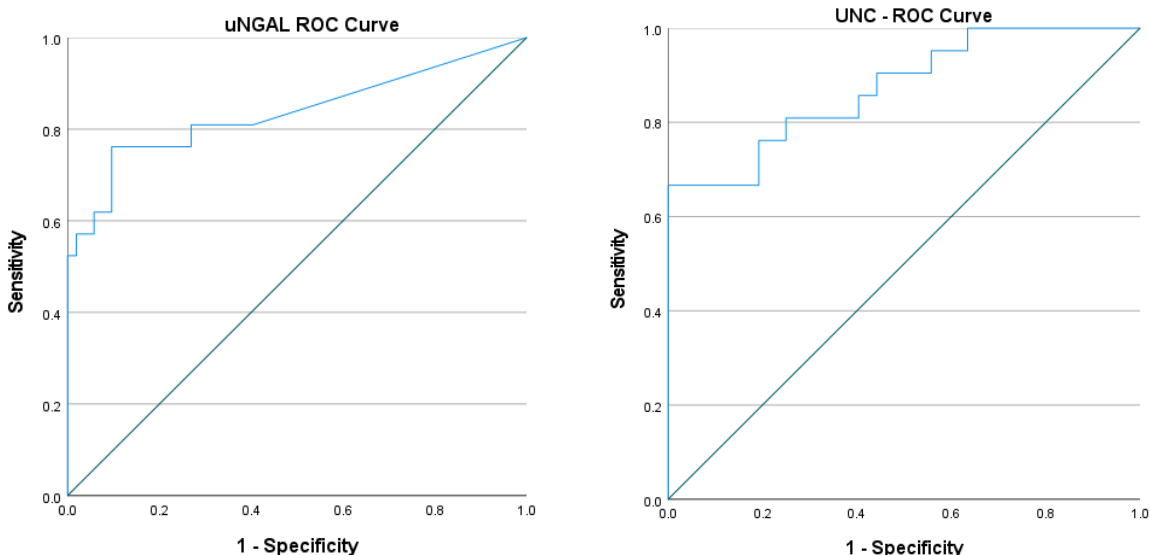
		AER	ACR	HbA1c	Chol	TG	HDL	LDL	BMI	pNGAL	eGFR	
											z	CKDEPI
uNGAL	rho			0.255	0.142	0.262	-0.089	0.066	0.273	0.042		0.115
	p	**	**	=0.031*	=0.237	=0.027*	=0.459	=0.584	=0.025*	=0.732	=	=0.336
UNC	rho	0.250	0.641	0.435	0.163	0.396	-0.152	0.081	0.178	-0.172	0.081	0.194
	p	=0.033*	<0.001*	<0.001**	=0.176	<0.001**	=0.207	=0.500	=0.149	=0.157	=0.510	=0.102

статистически значима корелация $p < 0.05$

статистически значима корелация $p < 0.01$

ROC анализът демонстрира много добра диагностична ефективност на uNGAL в отдиференциране на пациенти със ЗД I с повишен ACR (A1 vs A2/A3), с AUC-ROC – 0.836. При cut-off – 47.85 ng/mL, стойност над определената горна референтна граница, uNGAL има диагностична чувствителност и специфичност съответно 52% и 100%, отношение на положителна и отрицателна вероятност LR+ >52.00 и LR- 0.48 и положителна и отрицателна предсказваща стойност – 100% и 84%, в разграничаване на пациентите със ЗД I с ACR > 3 правилно да идентифицира пациенти със ЗД I с албуминурия е 86%. Така определената cut-off стойност може да се приеме като гранична стойност за ДБЗ при деца със ЗД I (Фиг. 34).

Съотношението UNC показва много добра диагностична точност в отдиференцирането на пациентите със ЗД I с албуминурия (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.873. Cut-off стойност, която има най-добри диагностични характеристики в отдиференциране на пациентите със ЗД I с ACR, с диагностична чувствителност и специфичност – 67% и 98%, отношение на положителна и отрицателна вероятност LR+ 35.10 и LR- 0.34 и положителна и отрицателна предсказваща стойност – 93% и 88%. Диагностичната ефективност, с която стойност на UNC > 3.86 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД I с албуминурия е 89%. Така определената cut-off стойност може да се приеме като гранична стойност за ДБЗ при деца със ЗД I (Фиг. 34).



Фигура 34. ROC криви на uNGAL и UNC в разграничаване на пациентите с повишен ACR при ЗД I

Статистическата обработка на данните показва, че pNGAL е подходящ маркер за отдиференциране на пациентите със ЗД I с леко понижена гломерулна филтрация, докато uNGAL и UNC за идентифициране на тези с повишен ACR и за откриване на ДБЗ сред пациентите със ЗД I. Определените cut-off стойности за бъбречно увреждане при пациенти със ЗД I са представени на таблица 27 (Табл.27).

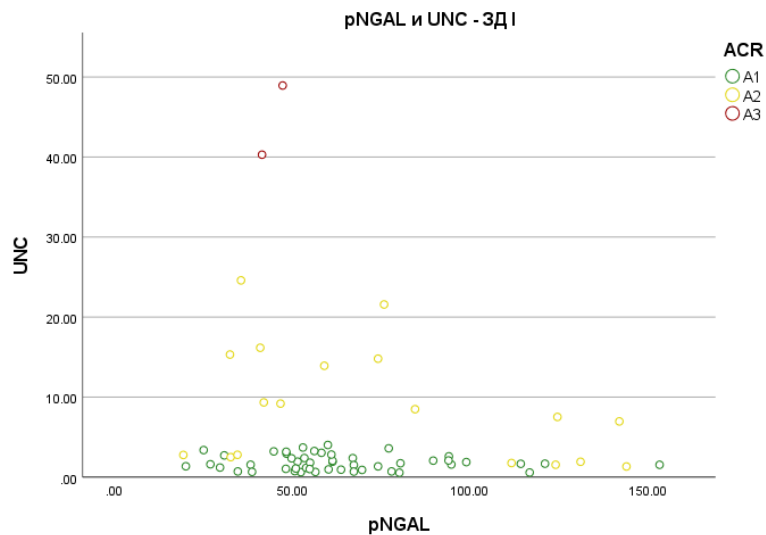
Таблица 27. Обобщено представяне на Cut-off стойностите при пациенти със ЗД I изведени в настоящото проучване

показател	критерий		ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС

Съкращения: ИП – истинско положителни, ИО – истинско отрицателни, ФП – фалшиво положителни, ФО – фалшиво отрицателни, ДЧ – диагностична чувствителност, ДС – диагностична специфичност

От така изведените данни може да се обобщи, че UNC показва по-добра диагностична ефективност от uNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД I с бъбречно увреждане. Ето защо е предпочетен при оценка ролята на комбинираното приложение на два маркера pNGAL и UNC. За да се определи значението на pNGAL и UNC за поставяне на диагнозата на ДБЗ при пациенти със ЗД I, дефинирано като ACR > 3g/mol, е проведен логистичен регресионен анализ. Когато и двата маркера се отчитат едновременно, те значимо прогнозира наличието на ДБЗ: $\chi^2 = 44.285$, $df = 2$, $p < 0.01$, като независимата променлива pNGAL ($p = 0.037$) допринася статистически значимо, но не подобрява значимо модела. Редуцираният регресионен модел, в който е включен само UNC, е статистически значим и съществено прогнозира наличието на ДБЗ: $\chi^2 = 43.505$, $df = 1$, $p < 0.001$. Моделът обяснява между 45% (Cox & Snell R^2) и 64%

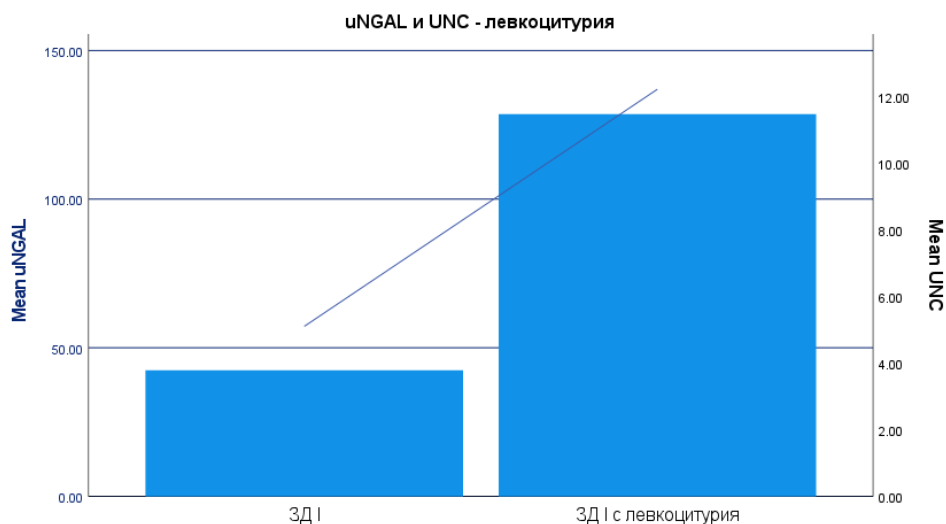
(Nadelkerkes R^2) от дисперсията и коректно диагностицира 90% от пациентите със ЗД I спрямо наличието бъречно увреждане (99% от пациентите без ДБЗ и 67% от пациентите с ДБЗ). Експонентата на регресионния коефициент $\text{Exp}(B)$ демонстрира, че повишението на UNC с 1 използва само pNGAL за поставяне на диагноза ДБЗ сред пациентите със ЗД I не е статистически значим ($p = 0.321$), а този който използва само uNGAL има по-малка сила ($\chi^2 =$



Фигура 35. Разпределение на резултатите за pNGAL и UNC при пациентите със ЗД I, разделени в зависимост от стойностите на ACR (ДБЗ)

При трима от насочените пациенти със ЗД I се констатира сигнификантна левкоцитурия и са изключени от последващата обработката на данните (\bar{x} - pNGAL = 73.06 ng/mL, uNGAL =

1
2
8
.
6
0
и
U
N
C
=



Фигура 36. Mean - uNGAL и UNC при пациенти със ЗД I без и със левкоцитурия

VI. ДИСКУСИЯ

1. Верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL.

на фирма Bioporto е латекс усилен имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL с адаптации и приложения за различни аналитични платформи. Времето за измерване на NGAL на биохимичен анализатор ADVIA 1800, с който е извършен анализът в проучването, е 10 мин. таргетна група пациенти. Тези характеристики определят приложимостта на теста в клиничната практика и в диагностиката на ОБУ [25]. Целевите групи в настоящото проучване са здрави лица и пациенти със ЗД с и без бъбречно увреждане. Данните в литературата сочат, че при част от здравите лица и при част от пациентите със ЗД без ДБЗ, може да се очакват концентрация на NGAL в урината около и под долната граница на количествено определяне на NGAL Test™ [10, 127]. С оглед оптимизиране на теста за целите на проучването е извършена верификация на метода и е изчислен и проверен аналитичния измервателен диапазон. В таблица 28 са представени аналитичните характеристики на NGAL Test™ за анализатор ADVIA 1800, по данни на фирма Bioporto, резултатите, получени в настоящото проучване, и допустимите критерии, използвани при оценка на аналитичните характеристики на метода (Табл. 28).

Таблица 28. Аналитични характеристики на NGAL Test™ на платформа ADVIA 1800

Оценявана характеристика	Показател	Bioporto	Проучване	Критерий
Откриваем минимум	LLOD	12 ng/mL	6 ng/mL	3*SD-blank*
Линейност	LLOQ-ULOQ	25–3000 ng/mL	12-3000 ng/mL	20% - 15%*
Невъзпроизводимост в серия – урина/ниска	CV%	*	6.43%	< 20%*
Невъзпроизводимост в серия – плазма/ниска	CV%	9.6%	5.26%	< 20%*
Невъзпроизводимост в серия – плазма/кл.значима	CV%	*	1.85%	< 20%*
Невъзпроизводимост в серия – плазма/висока	CV%	*	1.82%	< 20%*
Невъзпроизводимост във време – ниска контрола	CV%	1.7%	4.5%	< 20%*
Невъзпроизводимост във време – висока контрола	CV%	0.9%	2.7%	< 20%*
Недостоверност с ниска контрола	d%	*	0.34	< 10% Westgard rules
Недостоверност с висока контрола	d%	*	0.40	< 10% Westgard rules
Аналитична откриваемост - плазма		*	98% (95:101)	80 – 120%**
Аналитична откриваемост - урина		*	98%	80-120%**
Пренос на биологичен материал		*	-0.29%	<

[
]
] В

е

р

и

характеристики са съобразени с EMEA/CHMP/EWP/2009 Guideline on bioanalytical method на биологичния материал върху изследваните характеристики. При оценка на измервателния диапазон се установи стойност на LLOD равна на 6.00 ng/mL и на LLOQ равна на 12.00 ng/mL. Получените коефициенти на вариация при проверка на LLOQ ($x_0=12.00$ ng/mL – CV=17.52%) и ULOQ ($x_0=3000.00$ ng/mL – CV=1.55%) са в съответствие с международните изисквания и за целите на проучване е приложена линейност на NGAL TestTM на биохимичен анализатор възпроизводимост в серия и възпроизводимост във време. Данните от статистическата обработка показват много добра възпроизводимост в серия с коефициенти на вариация в ниска-референтна, клинично значима и патологична област значително по-ниски от допустимият критерий. Изведените CV% при изследване на възпроизводимост във време удовлетворяват както производствено обявените аналитични характеристики (CV% < 5%), така и международните изисквания. При оценка на недостоверност се констатира ниска стойност на d% като мярка за системна грешка и висока аналитична откриваемост като мярка за пропорционалната системна грешка. Данните от % carryover демонстрират, че анализаторът осигурява много добро разделяне на пробите, без пренос на биологичен материал между тях. При верифициране на метода латекс усилен имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL на фирма Bioporto на биохимичен анализатор ADVIA 1800 са констатирани много добри аналитични характеристики, в съответствие с производствено обявените и международните стандарти. Тестът показва висока аналитична надеждност при определяне на NGAL както в плазма, така и в урина. Въпреки това NGAL TestTM не успява да детектира с необходимата точност концентрации на анализа < 12 ng/mL, каквито стойности се очакват при част от здравите лица. Резултатите за възпроизводимост в серия в ниската област имат по-голямо разсейване спрямо тези в референтната и патологичната област, което е независимо от използвания биологичен материал. Установи се по-висок CV% при оценка на невъзпроизводимост във време с контролния материал в по-ниската концентрационна област. Следователно NGAL TestTM показва по-добри аналитични характеристики при определяне на високи в сравнение с ниски концентрации на анализа и е подходящ тест за детекция на патологични стойности, каквито се очакват при пациентите с бъбречно увреждане.

2. Референтни граници на NGAL. Биологична вариация

Към момента няма налични международни препоръки или насоки при анализа на NGAL, липсва достатъчно информация за биологичната вариация, източници на аналитична

интерференция и оптималния биологичен материал за анализ. По-голяма част от посочените в литературата „нормални стойности“ са измерени в относително големи групи, включени в клинично проучване като контролна група. Липсват големи многоцентрови проучвания за извеждане на референтни граници на NGAL, стратифицирани според възрастта, пола и етническата принадлежност [47, 98].

С оглед липсата на стандартизация референтните граници на pNGAL и uNGAL са в зависимост от използвания метод, платформа, биологичен материал за анализ, подбора и разпределението на референтната група [47, 98]. Сравнителен анализ, оценяващ възпроизводимостта между няколко налични в търговската мрежа анализи за NGAL, докладва добра сравнимост между резултатите получени от Bioporto ELISA и Bioporto PETIA и значими разлики с другите имуноанализи. Авторите посочват за неприложимо сравнението на резултатите от различни проучвания, при които се използват различни методи и аналитични платформи и подчертават необходимостта от хармонизиране и стандартизиране на анализа преди този биомаркер да влезе в рутинна практика [110].

Референтни граници на NGAL при възрастни. Биологична вариация

Подходящият материал за анализ при изследване на циркулиращите нива на NGAL е плазмата. Серумът не се препоръчва, тъй като могат да се отчетат фалшиво по-високи резултати поради дегранулация на неутрофилите по време на съсирването [98]. Сравнителен анализ между нивата на NGAL в EDTA и хепаринова плазма отчита по-високи стойности при използване на антикоагуланта литиев хепарин, авторите препоръчват използване на идентичен биологичен материал при сравнение на резултатите [87]. Производителя BioPorto, с който е извършен анализа, докладва очаквани стойности за pNGAL в EDTA плазма 37 – 106. Те посочват следната линейна регресия $NGAL(\text{хепарин}) = 1.01 \times NGAL(\text{EDTA}) + 16.6$ ($r^2 = 0,998$) и уточняват, че NGAL може да бъде анализиран от хепаринова плазма заедно с останалите биохимични параметри, което го прави подходящ показател в условия на спешност [25].

В настоящото проучване е избрана хепаринова плазма като материал за анализ при определяне на циркулиращите нива на NGAL. Този биологичен материал е предпочетен, тъй като позволява едновременно измерване концентрацията на pNGAL и тази на стандартни и рутинно използвани маркери за бъбречно увреждане. Така изведените референтни граници ще оптимизират клиничната приложимост на NGAL TestTM и правилната интерпретация на резултатите за pNGAL.

Референтните граници на NGAL при възрастни са определени в кохорта от 85 здрави лица на възраст от 34 – 75г, чрез имунотурбидиметричен анализ. Определеният референтен

интервал на pNGAL при възрастни лица е 25 – 119.49 ng/mL, не се установи сигнификантна разлика в стойностите на pNGAL между мъже и жени. Получените от нас резултати са сравними с данните в литературата, при които pNGAL е измерен с идентичен реактив и методология. Xiang D et al. (2013) определят нивата на NGAL в серум, чрез усилен с частици имунотурбидиметричен анализ (PETIA), сред 454 здрави доброволци, на възраст между 21 – ия персентил (207). Makris K et al. (2015) определят концентрацията на NGAL в EDTA плазма, чрез PETIA сред 200 здрави лица на възраст 18 – 65 г. Те рапортуват полово зависими референтни граници за pNGAL съответстващи на 5-ия и 95-ия персентил: при мъже – 38.7 –

При обработката на данните в настоящото проучване се констатира положителна корелация между стойностите на pNGAL и възрастта и отрицателна между eGFR и pNGAL. Установи се, че с увеличение на възрастта се наблюдава сигнификантно понижение на eGFR, което съответства на повишението на pNGAL. Най-ниска средна стойност на eGFR е отчетена при лицата > 60 г, което е паралелно на по-високите стойности на pNGAL в този възрастов период. Диференцирането на контролната кохорта по-възраст доведе до намаляване на броя лица в отделните подгрупи, което намали статистическата значимост на данните и ограничи възможността за извеждането на възрастово зависими референтни граници. Установената от нас положителна корелация между pNGAL и възрастта се цитира в част от проучванията. лицата под и над 45 г. и дефинират горна граница на референтния интервал в групата под 45 години < 116.52 µg/L, и в групата над 45 години < 126.9 µg/ (207). Makris K et al установяват слаба, но значима корелация между pNGAL и възрастта ($\rho = 0.177$, $p = 0.01$) (127). Наблюдаваната тенденция може да се обясни с физиологичните, възрастово обусловени промени в гломерулната филтрация, които са причина за повишение на циркулиращите нива на NGAL. С напредване на възрастта се развива фиброза на интимата на интерлобуларните артерии (артериална склероза), която създава хипоксично-исхемична среда и води до гломерулосклероза и последващата функционална недостатъчност с понижение на гломерулната филтрация [218]. NGAL е белтък с ниска молекулна маса, който се изчиства от циркулацията чрез бъбречна екскреция, като се подлага на гломерулна филтрация с последваща тубуларна реабсорбция. Следователно всяко намаление на гломерулната филтрация намалява екскрецията на NGAL с последващо повишение в системното кръвообращение [9, 64]. В Таблица 29 са представени срещаните в литературата и

определените от нас референтните граници за pNGAL (Табл. 29).

Таблица 29. Референтни граници за pNGAL при възрастни лица

Проучване	Брой	Материал	Метод	Единици	РГ	РГ-възраст	РГ-пол (м/ж)
BioPorto PI, 2011	80	EDTA-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	37 – 106	не	не
Xiang D, 2013 ^[207]	454	серум	PETIA BioPorto	µg/l	< 122.6	< 44г. <116.5 >45г. <126.9	не
Makris K, 2015 ^[127]	200	EDTA-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	28.7– 167.0	не ¹	38.7–157.6/ 24.4–142.5
И Петрова, 2018 ^[6]	16	EDTA-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	82.5 ± 18.8	не	не
Настоящото проучване	85	heparin-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	25 – 119.5	не ¹	не

РГ – референтни граници

няма изведени възрастово-зависими референтни граници, но е установена сигнификантна положителна корелация между pNGAL и възрастта

Към момента няма ясни насоки дали нормализирането чрез съотношението UNC подобрява диагностичната надеждност на uNGAL като тубуларен биомаркер. Delanaye P et al. (2011) оценяват биологичната интраиндивидуална вариация на uNGAL и UNC в проби от първа сутрешна и случайна порция урина и констатира наличието на значима разлика в стойностите на uNGAL (CV – 94%, 132%). Те препоръчват да се използва съотношението UNC, с цел избягване на дневната вариация в стойностите на uNGAL, поради разлика в осмоларитета на урината. Авторите акцентират върху предимствата на UNC в сравнение с абсолютните стойности на uNGAL в условия на спешност, когато се използва случайна порция урина [58]. Makris K et al. (2015) отбелязват, че при използване на съотношението UNC трябва да се вземат в предвид и детерминанти, повлияващи екскрецията на креатинина. При динамични състояния като ОБУ и бъбречна трансплантация скоростта на екскреция на креатинина се променя и невинаги следва тази на NGAL [127, 178].

Мерните единици на UNC, срещани в литературата, са в зависимост от използваните конвенционални или SI единици при измерване на креатинин в урината. Следователно резултатите за UNC са представени в µg/mmol или ng/mg (µg/g).

В настоящото проучване е избрана първа сутрешна урина като материал за анализ при определяне нива на uNGAL. С оглед трудното събиране на диурезна урина е предпочетена единична порция първа сутрешна урина, която е и стандартен материал за рутинно прилагания уринен анализ. Резултатите за UNC са представени в µg/mmol.

Определената от нас горна граница на референтния интервал на uNGAL в първа сутрешна урина при възрастни лица е 52.37 ng/mL, не се констатира сигнификантна разлика в резултатите за uNGAL между двата пола. Обработката на данните показва статистически значима разлика в резултатите за UNC между мъже и жени и са определени полово зависими

референтни стойности: при жени < 6.34 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, и при мъже < 3.36 $\mu\text{g}/\text{mmol}$.

Прегледът на данните в литературата показва, че референтни стойности за uNGAL зависят от използвания биологичен материал за анализ, аналитичен метод, платформа, подбора и абсолютни стойности или съотношение uNGAL/uCreatinine (UNC) [47, 98]. Стойностите на UNC между различните проучвания се влияят допълнително и от аналитичния метод при определяне на креатинин в урината и от използваните мерни единици. В част от цитираните проучвания UNC е представен в ng/mg (или $\mu\text{g}/\text{g}$), конверсионният фактор за преизчисление на UNC от ng/mg в $\mu\text{g}/\text{mmol}$ е 0.113 (1/8.842). Makris K et al. (2015) определят концентрацията на uNGAL в случайна порция урина сред 200 здрави лица на възраст 18 – 65 г., чрез PETIA и посочват, като горна граница на референтния интервал 54.5 ng/mL [127]. Schinstock et al. между 22 – 77 години. Те установяват статистически значима разлика в стойностите на uNGAL и UNC между двата пола и дефинират като горна граница на референтния интервал на uNGAL: при жени – 65 ng/mL, и при мъже – 23.4 ng/mL; на UNC: при жени \leq 89.9 ng/mg и при мъже \leq 27.2 ng/mg [166]. В изследването на Ж. Христова и сътр. (2015) са определени референтни граници на uNGAL и UNC, измерени в първа сутрешна урина, чрез ELISA метод сред 80 здрави лица на възраст 21 – 47 г. Те констатират сигнификантна разлика в стойностите между двата пола и дефинират полово зависими референтни стойности за uNGAL: при жени – 0.16 – 73.04 ng/mL, и при мъже – 5.54 – 23.86 ng/mL; за UNC при жени – 0.08 – 42.8 ng/mg, и при мъже – 5.24 – 20.72 ng/mg [10]. Определената в настоящото проучване горната граница на референтния интервал за uNGAL е сравнима с резултатите в проучването на Makris K et al. нас резултати са и полово диференцираните референтните граници на uNGAL и UNC от същия производител [153, 10]. Значимо по-високи референтни стойности са измерени в проучването на Cullen MR et al. (2012) чрез хемилуминисцен имуноанализ uNGAL < 107 $\mu\text{g}/\text{l}$ и UNC < 13 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и в проучването на Pennemans et al. (2013), в което анализът е извършен чрез ELISA тест на друг производител (от 2 до 5 пъти по-високи uNGAL и UNC). И двете проучвания потвърждават наличието на сигнификантна разлика в концентрацията на uNGAL спрямо пола и възрастта [53, 154]. В таблици 30 и 31 са представени срещаните в литературата и определените от нас референтните граници за uNGAL и UNC (Табл. 30, 31).

Таблица 30. Референтни граници за uNGAL при възрастни лица

Проучване	Брой	Материал	Метод	Единици	РГ	РГ-възраст	РГ-пол (м/ж)
-----------	------	----------	-------	---------	----	------------	--------------

Makris K, 2015 ^[127]	200	spot урина	PETIA BioPorto	ng/mL	< 54.5	не ¹	не
Schinstock C, 2013 ^[166]	125	диурезна урина	ELISA BioPorto	ng/mL	не	не	< 23.4 / < 65.0
Христова, 2015 ^[10]	80	сутрешна урина	ELISA BioPorto	ng/mL	< 65.0	не	< 23.86 / < 73.04
Cullen MR, 2012 ^[53]	174	spot- урина	CLIA Abbott	µg/l	< 107.0	19-40г. < 91 40-59г. < 59 60-88г. < 250	< 91.0 / < 129
Pennemans V, 2013 ^[154]	338 (0-95г.)	spot- урина	ELISA Biovend.	µg/l	не	21-30г.: <73.88/149.29 31-40г.: <87.54/153.60 41-50г.: <103.95/158.37 51-60г.: <123.70/163.62 61-70г.: <146.52/169.38 71-80г.: <176.31/175.68 >81г.: <211.16/182.58	
Настоящото проучване	85	сутрешна урина	PETIA BioPorto	ng/mL	< 52.37	не	не

установена е сигнификантна положителна корелация между uNGAL и възрастта

Таблица 31. Референтни граници за UNC при възрастни лица

Проучване	Брой	Материал	Метод uNGAL	Метод uCreat	Единици	РГ	РГ-възраст	РГ-пол (м/ж)
Schinstock C, 2013 ^[166]	125	диурезна урина	ELISA BioPorto	*	ng/mg	не	не	≤27.2/ ≤89.9
Христова, 2015 ^[10]	80	сутрешна урина	ELISA BioPorto	ензимен	ng/mg	не	не	<20.72/<42.8
Cullen MR, 2012 ^[53]	174	spot-урина	CLIA Abbott	Jaffe-кинетичен	µg/mmol	< 13	19-40г. <12 40-59г. <8 60-88г. <23	< 9/ <21
Pennemans V, 2013 ^[154]	338 (0- 95г.)	spot-урина	ELISA Biovend.	Jaffe-кинетичен	µg/g	не	21-30г.: <125.5/243.2 31-40г.: <122.1/236.5 41-50г.: <127.6/247.0 51-60г.: <142.9/276.6 61-70г.: <171.4/332.2 71-80г.: <221.0/428.9 >81г.: <307.8/598.3	
Настоящото проучване	85	сутрешна урина	PETIA BioPorto	Jaffe-кинетичен	µg/mmol	не	не	< 3.36/ <6.34

РГ – референтни граници

В настоящото проучване не се констатира статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между двата пола, каквато се цитира в повечето литературни източници [10, 53, 154, 166]. Това би могло да се обясни с влиянието на осмоларитета на урината върху абсолютните стойности на uNGAL при изследването му в единична порция урина. След нормализиране на резултатите за uNGAL към тези на креатинин в урина, разликата в стойностите на UNC между мъже и жени достигна сигнификантна значимост, каквато се описва в литературата. Тази полова зависимост в стойностите на UNC най-вероятно се дължи на влиянието на няколко фактора, които се потенцират. Експерименти при мишки доказват, че естрогените стимулират експресията на NGAL в редица органи, като млечна жлеза и матка [43]. Възможно е естроген-медирана експресия на NGAL в бъбречните тубули да обясни разликата в стойностите на uNGAL между мъже и жени, цитирана в някои

проучвания [182]. Друго възможно обяснение за по-високите резултати на UNC при жени са очакваните по-ниски концентрации на креатинин в урина, в резултат на по-малката мускулна маса [154]. В нашето проучване се констатира сигнификантна разлика в стойностите на креатинин в урина между двата пола, с по-високи резултати при мъже, с което може да се обясни половата зависимост в стойностите на UNC.

При 5-ма от насочените лица в проучването е установена сигнификантна левкоцитурия и са изключени от обработката на данните. Средната стойност на uNGAL измерена при тях е и на UNC е 23.32 $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Получените резултати за uNGAL и UNC са значимо по-високи от определените референтни граници, което потвърждава влиянието на левкоцитурията и инфекциите на пикочните пътища върху концентрацията на LCN-2 в урината. NGAL е острофазов протеин, чиято концентрация в урината се повишава в хода на инфекции на пикочните пътища, което се дължи на освобождаването му от активираните неутрофили и повишената му експресия от увредените тубуларни клетки [94]. Decavele AS et al. (2011) установяват корелация между броят на левкоцитите в урината и концентрацията на uNGAL. Те предлагат математическа корекция в случаите с пиурия ($> 100 \times 10^9/\text{l}$) и концентрация на NGAL в урината $>100 \mu\text{g}/\text{L}$ [57].

Референтни граници на NGAL при деца. Биологична вариация

Референтните граници на NGAL при деца са определени в кохорта от 42 здрави лица на възраст от 5 до 17 г., чрез имунотурбидиметричен анализ. Биологичният материал, който е използван за анализ при определяне на pNGAL е хепаринова плазма и при определяне на uNGAL е първа сутрешна урина. Изведените референтни граници при деца са: за pNGAL $<$ за uNGAL $< 47.30 \text{ ng}/\text{mL}$ и за UNC $< 3.48 \mu\text{g}/\text{mmol}$. При обработката на данните не се установи сигнификантна разлика по пол или възраст и за трите показателя.

Проучванията, които определят референтните граници на NGAL при деца са малко, като по-голяма част от посочените в литературата очаквани стойности при здрави деца са изведени в клинични изпитвания с контролни групи, оценяващи ролята на маркерът при бъбречно увреждане. Van Donge T et al. (2020), измерват нивата на pNGAL в EDTA плазма, чрез PETIA сред 142 здрави деца на възраст 0 – 15г. Авторите определят референтни граници за pNGAL съответстващи на 5-ия и 95-ия перцентил, при деца – 1.4 – 78.6 $\mu\text{g}/\text{L}$, не установяват значима разлика в стойностите на pNGAL между отделните възрастови групи, както между момичета и момчета [195]. В проучването на Papadopoulou-Marketou et al. (2017), дефинираната контролна група от 49 деца на възраст от 3 – 18 г. имат стойности на pNGAL между 5.1 – 81.4, измерени чрез ELISA метод [152]. В таблица 32 са съпоставени срещаните в литературата и определените от нас референтните граници за pNGAL при деца (Табл. 32).

Таблица 32. Референтни граници за pNGAL при деца

Проучване	Брой	Възраст	Материал	Метод	Единици	РГ
Van Donge T, 2020 ^[195]	142	0 - 15	EDTA-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	1.4 – 78.6
Paradouroulou M, 2017 ^[152]	49	3 - 18	плазма	ELISA BioPorto	ng/mL	5.1 – 81.4
Боцова В, 2018 ^[2]	15	7.8 ± 1.8	*	ELISA	ng/mL	154.9 ± 35.4
Настоящото проучване	42	5 – 17г	heparin-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	< 96.88

РГ – референтни граници

Bennett MR et al. (2015), измерват нивата на uNGAL в случайна порция урина, в кохорта от 368 здрави деца на възраст 3 – 18 години, чрез ELISA и определят като горна референтна граница на uNGAL при деца – 57.6 ng/mL (момчета < 73.1 ng/mL и момчета < 28.3 ng/mL) Проучването докладва полово зависими стойности на uNGAL за отделните възрастови групи, каквито рапортуват и Pennemans V et al. (2013) [27, 154]. Rybi-Szumińska et al. (2013) измерват нивата на uNGAL чрез ELISA в първа сутрешна урина при 172 деца и извеждат референтни граници за UNC както следва: 0.2 – 5.9 г. – 33.91 ng/mg, 6 – 9.9 г. – 26.23 ng/mg, 10 – 13.9 г. – 20.29 ng/mg и 14 – 17.9 г. – 15.69 ng/mg. Те констатираат, че стойностите на UNC в урината са по-високи при деца на възраст под 6 години и намаляват с възрастта [164]. В таблици 33 и 34 са представени срещаните в литературата и определените от нас референтните граници за uNGAL и UNC при деца (Табл. 33, 34).

Таблица 33. Референтни граници за uNGAL при деца

Проучване	Брой	Възраст	Материал	Метод	Единици	РГ – обща група (момчета/момчета)
Bennett MR, 2015 ^[27]	368	3 – 18г.	spot урина	ELISA BioPorto	ng/mL	3 – 18 г.< 57.6 (28.3/73.1) 3 – 5 г.< 39.1 (26.1/52.2) 5 – 10 г.< 58.5 (10.9/139.5) 10 – 15 г.< 66.8 (25.5/72.3) 15 – 18 г.< 74.7 (50.0/138.6)
Cangemi G, 2013 ^[41]	308	0.63–248 месеца	spot урина	CLIA Architect	ng/mL	<58.7
Pennemans V, 2013 ^[154]	338 (0-95г.)	0 – 20г.	spot- урина	ELISA Biovend	µg/l	0 - 10г. < (52.97/141.80) 10 - 20г. < (62.50/145.43)
Боцова В, 2018 ^[2]	15	7.8 ± 1.8	*	ELISA	ng/mL	53.31 ± 51.0
Настоящото проучване	42	5 – 17г	сутрешна урина	PETIA BioPorto	ng/mL	<47.30

РГ – референтни граници

Таблица 34. Референтни граници за UNC при деца

Проучване	Брой	Възраст	Материал	Метод NGAL	Метод uCreat.	Единици	РГ – обща група (момчета/момчета)
Rybi-Szumińska, 2013 ^[164]	172	0 – 18 г.	сутрешна урина	ELISA R&D	*	ng/mg	0.2-5.9 г. <33.91 6.0-9.9 г. < 26.23

				Systems			10-13.9 г. < 20.29 14-17.9 г. < 15.69
Cangemi G, 2013 ^[41]	308	0.63-248 месеца	spot урина	CLIA Architect	*	ng/mg	UNC < 68.2
Pennemans V, 2013 ^[154]	338 (0 - 95г.)	0-20 г.	spot урина	ELISA Biovend	Jaffe- кинетичен	µg/g	0-10 г. < (167.3/325.4) 10-20 г.< (139.0/269.9)
Стоянова Л, 2018 ^[7]	30 (13 деца)	23.6 ± 12.8	сутрешна урина	ELISA	Jaffe- кинетичен	ng/mol	< 0.190
Настоящото проучване	42	5 - 12г	сутрешна урина	PETIA BioPorto	Jaffe- кинетичен	µg/mmol	< 3.48

РГ – референтни граници

Резултатите, получени в нашето проучване, са близки до тези посочени в литературата, но не и идентични, което би могло да се обясни с големината и характеристиките на подбраната кохорта деца и използвания метод за анализ. Не се установи полова или възрастова статистически значима разлика в стойностите на pNGAL, uNGAL или UNC, каквато се цитира в част от проучванията [154, 164]. Възрастовата зависимост в стойностите на UNC може да се обясни с промените в мускулната маса характерни с напредване на възрастта, които се асоциират с по-високи стойности на серумния и уринния креатинин. В нашето проучване се установи отрицателна корелация между UNC и възрастта, която не достигна статистически значима разлика. Необходимо е включване на допълнителни лица, в различни възрастови групи, за да се оценят физиологичните възрастово обусловени промените на UNC при деца и при необходимост да се изведат референтни граници, диференцирани според годините.

Определените от нас референтни стойности за възрастни лица в българската популация измерени чрез имунотурбидиметричен анализ са: за pNGAL – 25 – 119.49 ng/mL, за uNGAL и за UNC – при жени <6.34 µg/mmol и при мъже < 3.36 µg/mmol. Констатира се значима положителна корелация между pNGAL и възрастта, която най-вероятно се дължи на физиологичното понижение на гломерулната филтрация с възрастта. Установи се сигнификантна разлика в стойностите на UNC между двата пола, която може да се обясни с физиологично по-високите резултати за уринен креатинин при мъже, в сравнение с жени.

Определените от нас референтни граници за деца в българската популация, измерени чрез имунотурбидиметричен анализ, са: за pNGAL < 96.88 ng/mL, за uNGAL < 47.30 ng/mL и за . Не се установи разлика по пол или възраст и за трите показателя. В таблица 35 са представени обобщено референтните граници, получени в настоящото проучване (Табл. 35).

Таблица 35. Определени в настоящото проучване референтни граници на NGAL

Показател	Материал	Метод	Единици	РГ-мъже	РГ-жени	РГ-деца
UNC	1 ^{-ва} сутрешна урина	PETIA	µg/mmol	< 3.36	< 6.34	< 3.48
uNGAL	1 ^{-ва} сутрешна урина	PETIA	ng/mL	< 52.37		< 47.30

pNGAL	hep. плазма	PEPIA	ng/mL	25 – 119.5	< 96.88
-------	-------------	-------	-------	------------	---------

Данните в литературата показват, че е неприложимо сравнението на резултати от проучвания, при които се използват различни методи и аналитични платформи [110]. С оглед правилната интерпретация на стойностите на NGAL, е необходимо използване на полово, възрастово и методологично изведени референтни граници. Прилагането на нормализирани стойности на uNGAL (UNC) се препоръчва пред абсолютната концентрация на маркера, при определянето му в единична порция, поради дневните колебания в осмоларитета на урината. При тълкуване на резултатите на UNC следва да се отчита влиянието на физиологичните промени в стойностите на уринния креатинин, аналитичният метод, използван при определяне на уринен креатинин, и мерните единици в които е представено съотношението. Оценката на стойностите на uNGAL и UNC трябва да се съобрази с резултатите от уринния седимент, като се отчита влиянието на левкоцитурията и ИПП върху маркера и съотношението.

3. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ

ДБЗ е хронично усложнение на ЗД, водещо до повишена сърдечно-съдова заболеваемост и смъртност и риск от развитие на ТБН. ДБЗ е клиничен синдром при пациенти със ЗД, при който са налице критерии за ХБЗ [67]. В препоръките на KDIGO 2020 (Clinical Practice) бъбречното увреждане при ЗД се диагностицира и класифицира спрямо критериите за ХБЗ GFR и AER или ACR са основни критерии за диагноза, класификация и стратификация на риска на ХБЗ, но те показват редица ограничения. Към момента най-често за оценка на GFR се използват креатинин базирани формули като MDRD, СКD-EPI и формулата Bedside при деца. Въпреки тяхната стандартизацията, последни данни показват относителна неточност поради различия в детерминанти повлияващи стойностите на креатинина и ниска диагностична надеждност при високи стойности на GFR [108, 121, 195]. Повишената AER често е първият клиничен индикатор за наличието на ДБЗ, но не винаги е маркер за бъбречната дисфункция при диабет. ДБЗ е възможно да се развие и при пациенти с нормална AER, при които е налице не-албминуричен фенотип на бъбречното увреждане [119]. Повишени стойности на AER се наблюдават преходно при физиологични състояния, както и при редица патологични причини извън ДБЗ [187]. С оглед ограниченията на AER и GFR е необходимо въвеждането и валидирането на нови показатели за ранна диагностика на ДБЗ и стратификация на риска от прогресията му до ТБН [121].

ДН се приема като заболяване, засягащо преимуществено гломерула, водещо до фокална или дифузна гломерулосклероза. Въпреки това редица проучвания посочват предиктивната

роля на тубуло-интерстициалните лезии в прогресията на ДН [95, 148, 180]. Все повече данни сочат, че тубулното увреждане е първично нарушение, инициращо развитието на бъбречна дисфункция при пациентите със ЗД, което променя традиционната парадигма за патогенезата на ДН – от гломерулоцентрична към тубулоцентрична хипотеза [66]. Тубуларни маркери, докладвани като предиктори на ДБЗ, са kidney injury molecule-1, α 1-microglobulin, N-acetyl- β -protein, neutrophil gelatinase-associated lipocalin др. [71].

NGAL е показател за бъбречно структурно увреждане, очертаващ се като един от най-обещаващите тубуларни биомаркери в диагностика на острите и хронични бъбречни заболявания. Увеличените стойности на NGAL в плазма и урина индикират степента на субклинична тубуларна увреда и се явяват по-ранни маркери за настъпването на бъбречна дисфункция от класическите гломерулни показатели [32, 85, 120]. Биологичните източници и причините за увеличена концентрация на NGAL в плазма и урина могат да бъдат различни. Циркулиращият NGAL свободно се филтрира през гломерулите, но в значителна степен се реабсорбира в проксималните тубули [153]. В отговор на бъбречно увреждане е установена повишена експресия на NGAL и РНК в бримката на Хенле и събирателните каналчета [167]. Това означава, че патологичната концентрация на NGAL в урина се дължи на бъбречна увреда, която засяга реабсорбцията му в проксималния тубул и/или индуцира неговия синтез *de novo* в дисталния тубул. По отношение на плазмения NGAL самият бъбрек не се явява основен източник, той произхожда и от други органи: черен дроб, бял дроб, активирани неутрофили, макрофаги и други клетки на имунната система. Освен това всяко намаление на гломерулната филтрация намалява екскрецията на NGAL с последващо повишение в системното кръвообращение [9]. Данните в литературата посочват NGAL като маркер с добър диагностичен профил в диагностиката на ДБЗ. Проучванията, проведени при пациенти със ЗД, демонстрират, че стойностите на NGAL корелират с прогресията на АЕР, със спада на eGFR, с тежестта на бъбречното увреждане и с риска от прогресия до ТБН [18, 22, 86, 126]. Въпреки това редица причини извън ДБЗ могат да индуцират повишена експресия на NGAL. Всичко това налага необходимостта от допълнителни изследвания, за да се изясни ролята на NGAL в диагностиката на ДБЗ.

3.1.

Съгласно насоките на KDIGO 2020, възприетите в настоящото проучване критерии за диагноза на ДБЗ са $ACR > 3 \text{ g/mol}$ и/или $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ [109]. За да оценим диагностичната надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ при пациенти със ЗД II, в кохортата са включени 92-ма пациенти със ЗД II, на възраст от 18 до 89 г., от които 55% са

жени и 45% са мъже. pNGAL е измерен в хепаринова плазма, а uNGAL в първа сутрешна урина, като резултатите за UNC са представени в $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Пациентите са разпределени по групи в зависимост от стойностите на ACR, eGFR и от наличието на ДБЗ. Формулата, която е използвана за изчисление на eGFR при пациенти със ЗД II е CKD-EPI.

Статистическата обработка на данните показва, че стойностите на pNGAL, uNGAL и UNC в цялата пациентска кохорта ЗД II са сигнификантно по-високи в сравнение с контролната група възрастни лица. В таблица 36 са обобщени медианите и интерквартилните обхвати на pNGAL, uNGAL и UNC в отделните подгрупи пациенти със ЗД II, разделени спрямо стойностите на ACR, eGFR и в зависимост от наличието на ДБЗ. Посочени са групите, между които се констатира статистически значима разлика (Табл. 36).

Таблица 36. Определените в настоящото проучване медиани на NGAL в кохортата - ЗД II

Категория	Критерий	N	pNGAL(ng/ml) median (IQR)	uNGAL(ng/ml) median (IQR)	U median (IQR)
контролна група	клинично здрави	85	7 ²	1 ⁴	1
ЗД II група	ЗД II				
A1	ACR<3 g/mol				3 ³
A2	ACR – 3-30 g/mol			(2
A3	ACR<30 g/mol			9	2
≤G2	eGFR≥60ml/min/1.73m ²		6	2	4
≥G3	eGFR<60ml/min/1.73m ²	2	1	4	6
ЗД без ДБЗ	ACR<3 g/mol и eGFR≥60ml/min/1.73m ²			8	8
ЗД с ДБЗ	A €			7	7

сигнификантна разлика със контролната група, ²сигнификантна разлика с A1, ³сигнификантна разлика с A2, разлика със ЗД без ДБЗ, ⁸сигнификантна разлика със ЗД с ДБЗ

В настоящото проучване pNGAL се очерта като маркер за оценка на гломерулната филтрация, като пациентите със ЗД II с понижена гломерулна филтрация, дефинирана като спрямо контролната група, така и спрямо пациентите със ЗД II със запазена гломерулна филтрация. ROC анализът демонстрира добра диагностична ефективност на pNGAL в отиференциране на пациенти със ЗД II с eGFR < 60 mL/min/1.73m² с AUC-ROC – 0.753. При cut-off – 121.65 ng/mL маркерът има диагностична ефективност – 82 % в разграничаване на

пациентите със ЗД II с понижена гломерулна филтрация. Установи се сигнификантна корелация на pNGAL с маркерите за оценка на гломерулната филтрация – положителна с концентрацията на урея и креатинин в плазма и отрицателна с eGFR.

По-голяма част от проучванията, които се срещат в литературата, оценяват ролята на pNGAL като маркер за ДБЗ при пациенти с нормална гломерулна филтрация. Volignano D et al. установяват положителна корелация между pNGAL и серумния креатинин и отрицателна с в кохорта от 59 пациенти със ЗД II с $GFR > 30 \text{ mL/min}$ ($p < 0.05$ и $p < 0.01$) [33]. Kaul A et al. констатира отрицателна корелация между pNGAL и eGFR в група от 144 пациенти със ЗД II с $eGFR > 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ [107]. Žyčka A et al (2018) оценяват предиктивна стойност на гломерулни и тубуларни маркери като индикатори за ранно бъбречно увреждане при 80 пациента със ЗД II с медиана на $eGFR=92.4 \text{ mL/min/1.73m}^2$. Проучването проследява ретроспективно промените в eGFR и връзката им с изследваните биомаркери, те установяват понижение на гломерулната филтрация при 17 пациента с медиана на $eGFR=5.2$ Žyčka A et al. (2018) не установяват корелация между концентрацията на циркулиращия NGAL и eGFR (СКД-EPI) в тази кохорта, но от събраните ретроспективни данни констатира, че концентрацията на NGAL в плазма и урина корелира с промените в eGFR. Авторите посочват, че стойност на pNGAL над $61 \mu\text{g/L}$ е значително свързана с понижението на eGFR [221].

GFR е лабораторен маркер оценяващ бъбречната функция и критерий за класификация на ХБЗ. „Златен стандарт“ в определянето на GFR е измерване клирънса на екзогенната субстанция инулин. Този метод е инвазивен, трудоемък и не се прилага в рутинната практика. Към момента най-често за оценка GFR при възрастни лица се използват креатинин базирани формули като MDRD и СКД-EPI, които включват променливи величини зависещи от възрастта, пола и етническата принадлежност. Те са базирани на концентрация на серумен креатинин, определен с метод, чиято калибрация е проследима до референтен метод – ID-MS. MDRD и СКД-EPI имат стойност на P30 между 80% и 90%, което означава, че eGFR, генериран от тези формули, има 90% шанс да бъде в рамките на $\pm 30\%$ от реалната GFR [187]. СКД-EPI демонстрира значително по-голяма точност от MDRD, при изчисление на eGFR в подгрупата с $GFR > 90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Следователно СКД-EPI е предпочитана при пациенти със ЗД, тъй като най-ранната хемодинамична аномалия е гломерулната хиперфилтрация с повишение на $GFR > 120 \text{ mL/min/1.73m}^2$ [122].

Наблюдаваната от нас и в част от проучванията връзка между гломерулната филтрация и концентрацията на pNGAL може да се обясни с бъбречната екскреция на протеина, като всяко понижение на гломерулната филтрация намалява клирънса на NGAL с последващата му акумулация в системната циркулация [9]. Характерните морфологични промени при ДН

включват задебеляване на гломерулната базална мембрана, мезангиална експанзия, хиализиране на аферентната и еферентната артериола, редуциране на числената плътност на подоцитите, нодуларна или дифузна гломерулосклероза и др. [82]. Тези структурни промени водят до последващата функционална недостатъчност, нарушена екскреторна функция на бъбрека и понижаване на гломерулната филтрация [8].

В настоящото проучване не се установи корелация между pNGAL и ACR. Статистически значимо по-високи резултати спрямо контролната група имат единствено пациентите в А3, което е в съответствие с очакваното по-тежко бъбречно увреждане и по-силно намалената гломерулна филтрация. Редица проучвания посочват клиничната приложимост на pNGAL в диагностиката на патологична албуминурия и на бъбречно увреждане при пациенти със ЗД II. Първите данни за ролята на NGAL като маркер за ДБЗ са докладвани от Volignano D et al. . Те установяват сигнификатно по-високи резултати за pNGAL при пациентите със ЗД II с нормална албуминова екскреция в сравнение с контроли (52.5 vs 233.6 ng/mL), но не констатира значима корелация между pNGAL и ACR [33]. Mahfouz MH et al. (2016) докладват по-високи стойности на pNGAL при пациентите със ЗД II с умерено и силно повишен ACR спрямо референтната група (97.8, 131 vs 46.5 ng/mL) и посочват положителна корелация на показателя с ACR ($r = 0.582$, $p = 0.0001$) [126]. Мета анализ, оценяващ ролята на pNGAL в диагностиката на ДБЗ, установява обединена чувствителност и специфичност – 79% и 87%, обединено отношение на положителна (PLR) и отрицателна вероятност – 5.97 и 0.24. Анализът обобщава, че pNGAL е подходящ маркер за потвърждаване на ДБЗ, но има ограничена роля в отхвърляне на диагнозата [91].

Срещаните в литературата средни и cut-off стойности на NGAL за ДБЗ се различават значимо помежду си, което може да се обясни с хетерогенните условия за анализ. С оглед липсата на стандартизация резултатите за pNGAL и uNGAL са в зависимост от използвания метод, платформа, биологичния материал за анализ, подбора и разпределението на изследваната група, начин на представяне на резултатите (средна стойност или медиана) и от използваните мерни единици [47, 98]. Това потвърждава тезата, според която е неприложимо сравнение на резултати за NGAL между различни проучвания и посочва необходимостта от хармонизиране и стандартизиране на анализа [110]. В таблица 37 са представени резултати за pNGAL, които се срещат в литературата в проучвания, проведени при пациенти със ЗД II, и определените в настоящото проучване в кохортата пациенти със ЗД II (Табл. 37).

Таблица 37. Средни стойности/медиани на pNGAL при пациенти със ЗД II

Проучване	КГ	A1	A2	A3	Единици			Метод
[Не	Да	
[Да	Да	

						Не	Не	
						Да		
						Да		
Żyłka A, 2018 [221]					µg/L	Не	Не	
						Да	Да	
						Да	Не	
Настоящото проучване						Не	Да	

липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$), ² липсва сигнификантна разлика между A2 и контролна група ($p > 0.05$), ² липсва сигнификантна разлика между A2 и A1 ($p > 0.05$), ³ липсва сигнификантна разлика между A3 и A2 ($p > 0.05$)

Съкращения: КГ – контролна група; A1-пациенти със ЗД с нормална AER/ACR; A2- пациенти със ЗД с умерено повишена AER/ACR; A3- пациенти със ЗД със силно повишена AER/ACR; +ACR –сигнификантна положителна корелация с AER/ACR ($p < 0.05$); -GFR - сигнификантна отрицателна корелация с GFR ($p < 0.05$).

Доскоро се препоръчваха следните стадии в развитието на ДН [8]:

1. Стадий 1 – хиперфилтрация – увеличаване с 20 – 50% на гломерулната филтрация, нормоалбуминурия и хистологично увеличен гломерулен размер.
2. Стадий 2 – нормоалбуминурия – увеличена с 20 – 40% гломерулна филтрация, нормоалбуминурия и хистологично задебелена базална мембрана.
3. Стадий 3 – начална диабетна нефропатия (албуминурия) – екскреция на албумин в урина 30 –300/24 h, първоначално повишена, но с напредване на протеинурията намалена гломерулна филтрация и хистологично със задебеление на гломерулната базална мембрана и мезангиална експанзия.
4. Стадий 4 – клинично изявена нефропатия – екскреция на албумин в урина над 300/24 h, снижена гломерулна филтрация и напреднали хистологични промени.
5. Стадий 5 – бъбречна недостатъчност – постепенно отпадане на бъбречната функция до степен на ТБН и хистологично с напреднала гломерулопатия.

В естественият ход на бъбречното увреждане при ЗД, понижението на eGFR е най-често късен индикатор за наличие на ДБЗ [121]. Следователно, биомаркери, които корелират само с понижението на eGFR, но не и с албуминурията, не са подходящи за диагностика на ДБЗ. Тази констатация може да обясни и получените от нас резултати и извода, че самостоятелното използване на pNGAL няма необходимата ефективност за рутинна диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД II.

В настоящото проучване се установи, че в кохортата пациенти със ЗД II стойностите на uNGAL и UNC корелират сигнификантно с промените в албуминовата екскреция, като UNC показва по-добра зависимост с ACR от uNGAL. Стойностите на uNGAL и UNC нарастват

прогресивно от A1 до A3, като сигнификантна разлика се констатира между A1 vs A2 и между A1 vs A3. Пациентите със ЗД II с умерено и силно повишен ACR имат статистически значимо по-високи резултати за uNGAL и UNC от контролната група, като пациентите с нормоалбуминурия имат и сигнификантно по-високи резултати за UNC. Очерта се полово разлика в стойностите на UNC в отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо ACR и eGFR. Жените имат по-високи резултати за UNC от мъжете във всяка една от подгрупите, като разликата е сигнификантно значима само в подгрупа A1 и в подгрупата с eGFR ≥ 60 полово зависими cut-off стойности на UNC за бъбречно увреждане.

ROC анализът демонстрира добра диагностична ефективност на uNGAL в отиференциране на пациенти със ЗД II с повишен ACR (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.776. Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 53.30 ng/mL успява правилно да идентифицира пациент със ЗД II с ACR > 3.0 g/mol, е 67 %. Съотношението UNC показва много добра диагностична точност в разграничаване на пациентите със ЗД II с албуминурия (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC при жени – 0.845, и при мъже – 0.904. При Cut-off стойност при жени – и при мъже – 3.72 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, диагностичната ефективност на маркера е 80% и 92% в откриване на пациентите със ЗД II с ACR > 3.0 g/mol.

Стойностите на uNGAL и UNC са сигнификантно по-високи при пациентите със ЗД II с ДБЗ (дефинирано като ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 mL/min/1.73m²), в сравнение с пациентите със ЗД II без ДБЗ и контролната група. Пациентите със ЗД II без ДБЗ имат и статически значимо по-високи резултати за UNC от референтната група.

ROC анализът демонстрира добра диагностична надеждност на uNGAL (AUC-ROC – 0.787) и UNC (AUC-ROC при жени – 0.845, и при мъже – 0.904) в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II (ЗД без ДБЗ vs ЗД с ДБЗ). Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 53.30 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД II с ДБЗ е 65 %. При cut-off стойност на UNC при жени – 6.87 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, и при мъже – 3.72 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, маркерът има диагностичната ефективност 69% и 89% в разграничаване на пациентите със ЗД II с ДБЗ. UNC има по-добра диагностична точност от в диагностициране на пациенти с ДБЗ, самостоятелното използване на маркера статистически значимо различава пациентите със ЗД II с бъбречно увреждане. Увеличението на UNC с 1 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ при пациентите със ЗД II повишава вероятността за ДБЗ при жени 1.16 пъти, а при мъже 2.40 пъти.

По-голяма част от проучванията при пациенти със ЗД II, които се срещат в литературата, дефинират ДБЗ като повишение на AER/ACR. Volignano D et al. (2009) установяват при пациенти със ЗД II, позитивна корелация между uNGAL с ACR ($p < 0.01$) и негативна

корелация с GFR ($p < 0.005$), сигнификантна разлика в стойностите на uNGAL между пациентските групи, разделени спрямо ACR и значимо по-високи резултати спрямо контролната група (6.5 vs 51.1 vs 105.9 vs 255.6 ng/mL) [33]. Žyřka A et al. (2018) изследват ролята на гломерулни и тубуларни маркери в диагностиката на ДБЗ при пациенти със ЗД II и констатират значима корелация между ACR с uNGAL ($p < 0.001$) и с UNC ($p = 0.002$), както и сигнификантно по-високи стойности на uNGAL и UNC в групата с ACR > 30 mg/g в сравнение с кохортата с ACR < 30 mg/g (24.7 vs 10.3 μ g/L, 35.1 vs 9.02 μ g/g) [221]. Данните и от други проучвания потвърждават клиничната приложимост на uNGAL и UNC в диагностиката на бъбречното увреждане сред пациенти със ЗД II. Литературните източници посочват, че резултатите на uNGAL и UNC корелират с прогресията на албуминовата екскреция, със спада на eGFR и с тежестта на ДБЗ при пациенти със ЗД II (Табл. 38, 39) [22, 73, 107, 173, 177, 197].

Таблица 38. Средни стойности/медиани на uNGAL при ЗД II

Проучване	Показател	КГ	A1	A2	A3	Единици	р	р	Метод
[Да	Да	
[Да		
Žyřka A, 2018 _[221]						μ g/L	Да	Не	
[Да		
[Не		
[Да	
[Да		
[Да	Да	
[Да	Не	
Настоящо проучване							Да	Да	

липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$)

липсва сигнификантна разлика между A3 и A2 ($p > 0.05$)

Съкращения: КГ – контролна група; A1-пациенти със ЗД с нормална AER/ACR; A2- пациенти със ЗД с умерено повишена AER/ACR; A3- пациенти със ЗД със силно повишена AER/ACR; +ACR –сигнификантна положителна корелация с AER/ACR ($p < 0.05$); -GFR - сигнификантна отрицателна корелация с GFR ($p < 0.05$).

Таблица 39. Средни стойности/медиани на UNC при ЗД II

Проучване	Показател	КГ	A1	A2	A3	Единици	р	р	Метод
Žyřka A, 2018 _[221]						μ g/g	Да	Не	
[μ g/g	Да	Да	
[Да	Да	

[Да	Не	
Настоящо проучване							Да	Да	

установена е статистически значима разлика в стойностите на UNC между мъже и жени
ета анализ, оценяващ ролята на uNGAL и UNC в диагностиката на ДБЗ, установява, че в деференцирането на пациентите със ЗД II с патологична албуминурия uNGAL има обединена чувствителност и специфичност - 83% и 81% с AUC-ROC – 0.89, а UNC обединена чувствителност и специфичност - 42% и 73% с AUC-ROC – 0.69. Анализът констатира, че uNGAL и UNC са ценни биомаркер за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД II, като диагностична им точност варира от умерена до висока според стойностите на AUC-ROC [106] Tang XY et al. (2019) обобщават данните за ролята на uNGAL в разграничаване на пациенти с специфичност - 82% и 81% с AUC-ROC-0.88 в проучванията с напречно и обединена чувствителност и специфичност – 96% и 89% с AUC-ROC-0.98 в кохортните проучвания. Авторите констатираат, че натрупаните доказателства показват ефикасността на uNGAL като маркер за бъбречно увреждане при ЗД (Табл. 40) [179].

Таблица 40. Диагностична ефективност на uNGAL и UNC в разграничаване на пациентите със ЗД II с ACR >3.0 g/mol

Проучване	Показател	cut-off	диници	ДЧ	ДС	LR+	LR-	ППС	ОПС	ДЕ
[177,91]	uNGAL		ng/ml							
Žyška A, 2018[221,91]	uNGAL		µg/l					39%	90%	65%
[106]	uNGAL	49.0	ng/ml	90%	83%	5.29	0.12	90%	83%	87%
[22,91]	uNGAL	8.8		67%	89%	6.09	0.37	89%	69%	77%
настоящо проучване	uNGAL	53.30	ng/ml	47%	90%	4.67	0.59	84%	60%	67%
Žyška A, 2018[221]	UNC		µg/g							
[106]	UNC	50.0								
[106]	UNC	.0								
настоящо проучване	UNC-жени			%	%			8	%	%
настоящо проучване	UNC-мъже									

ДЧ – диагностична чувствителност, ДС – диагностична специфичност, LR+ отношение на положителна вероятност, LR- отношение на отрицателна вероятност, ППС – положителната предсказваща стойност, ОПС – отрицателната предсказваща стойност, ДЕ – диагностична ефективност

Към момента AER/ACR е най-ранният лабораторен маркер за наличието на ДБЗ, критерий за класификация на ДБЗ и предиктор на кардиоваскуларните усложнения при ЗД [187]. Наблюдаваната от нас и в част от проучванията връзка между uNGAL и UNC с AER/ACR при пациенти със ЗД II може да се дължи на общи и потенциращи се механизми при ДБЗ, които водят до патологична екскреция и на двата протеина. Албуминът е отрицателно зареден

белтък с молекулна маса 69 kDa, който се появява в урината в патологична концентрация при загуба на „товарното сито“ на гломерулната филтрационна бариера и е най-добрият маркер за селективната гломерулна протеинурия. Развитието на ДН води до увреждане на гломерулната филтрационна бариера, включваща капилярен ендотел, гломерулна базална мембрана и подоцити, което е причина за повишена екскреция на албумин. Но все повече данни сочат, че в развитието на патологична албуминурия роля има и тубуларното увреждане, което ограничава реабсорбция му от многолигандния рецептор мегалин/кубилин [102]. Проучвания върху животни показват, че в ранните стадии на ДБЗ реабсорбция на албумин намалява, без да се увеличава гломерулната му филтрация, което може да се обясни с намалена албуминова ендоцитоза или с намалена експресия на рецептора мегалин/кубилин [183]. Според „хипотеза за извличане“ гломерулите филтрират високи нива на албумин, който се появява в урината в патологично количество, само ако настъпи нарушение в тубуларната реабсорбция [49]. От друга страна патологичната "гломерулна" албуминурия може да превиши капацитета за реабсорбция на увредените тубуларни клетки [102]. Персистиращата протеинурията е също причина за прогресивно увреждане на бъбречния паренхим, което може да ускори развитието на ДБЗ, като активира възпалителни пътища в проксималните епителни клетки и инициира тубулоинтерстициално възпаление и фиброза [216]. Следователно патологичната албуминурия може да е и индикатор за тубуларно увреждане. NGAL е положително зареден белтък ($pI > 7.4$) с ниска молекулна маса (25 – 70 kDa), който свободно се филтрира през гломерула, но се реабсорбира в проксималните бъбречни каналчета, чрез мегалин/кубилин-зависима ендоцитоза. Чрез *in situ* хибридизация е доказано, че в отговор на тубуларно увреждане настъпва интензивна експресия на NGAL иРНК от бримката на Хенле и събирателните каналчета. Следователно повишена екскрецията на NGAL може да настъпи при ренална увреда, която засяга реабсорбцията му в проксималния тубул и/или индуцира неговия синтез *de novo* в дисталния тубул. Това обяснява защо NGAL е определян като тубуларен маркер [9, 98, 121, 153]. Белтъците NGAL и албумин имат общ механизъм на реабсорбция в проксималните тубули и при всяко увреждане на бъбречните каналчета може да се очаква увеличена екскрецията и на двата протеина. Едновременно с това, патоморфологичните промени при ДН засягат както гломерула, така и тубулоинтерстициума на бъбрека, като абнормната протеинурия играе също важна роля в патогенезата на тубуларното увреждане, следователно при ДБЗ може да се очаква повишение както на гломерулни (албумин), така и за тубуларни биомаркери (албумин и NGAL).

В нашето проучване се констатира, че пациенти със ЗД II с $ACR < 3$ g/mol и пациенти без бъбречно увреждане имат по-високи резултати за UNC в сравнение с контролната група възрастни лица. Резултатите от редица проучвания демонстрират значимо по-висока

концентрация на NGAL в плазма и урина при пациенти със ЗД с нормална скорост на албуминова екскреция в сравнение с контролна група [11, 22, 33, 69, 76, 116, 144, 177, 190, значима разлика в стойностите на показателя, както между отделните стадии на ДБЗ, така и между пациентите със ЗД II с нормален ACR и контроли. Те определят cut-off стойност на описват NGAL като маркер за тубулоинтерстициално увреждане, който може да установи развитието на ДБЗ преди неговото диагностициране с повишената AER, и определят NGAL като полезен и неинвазивен показател за диагностика на ДБЗ [107]. Повишената AER често е първият клиничен индикатор за наличието на ДБЗ, но не винаги е маркер за бъбречната дисфункция при диабет. ДБЗ е възможно да се развие и при пациенти с нормална AER, при които е налице не-албуминуричен фенотип на бъбречното увреждане [119]. Както и не всички пациенти с патологична албуминурия развиват прогресивна бъбречна дисфункция [55]. Хистологични промени в тубулоинтерстициума, които могат да се наблюдават при ДН са тубуларно-епителна клетъчна хипертрофия, задебеляване на тубуларната базалната мембрана, епително-мезенхимен преход, натрупване на гликоген, тубулоинтерстициална фиброза и тубуларна атрофия [158]. Някои от тези промени се развиват първично и не са индуцирани от гломерулната патология [181]. Duan S et al. (2021) посочват и акцентират върху ролята на структурни и функционални промени в бъбречните тубули, които могат да инициират и да стимулират бъбречната дисфункция при ЗД и обобщават, че са натрупаните доказателства за промяна в традиционната парадигма за развитието на ДН – от гломерулоцентрична към тубулоцентрична [66]. Според хипотезата за „тубуларна фаза“ на ДБЗ тубулното увреждане е първично нарушение инициращо развитието на бъбречна дисфункция при пациенти със ЗД, следователно структурен тубуларен маркер като NGAL може да бъде по-ранен лабораторен признак за ДБЗ от AER [107, 116].

Патогенезата на ДН е сложна и многофакторна, в развитието ѝ участват хемодинамични и метаболитни фактори индуцирани от хипергликемията и/или инсулиновия дефицит като хипоксия, оксидативен стрес, активиране на редица възпалителни и апоптотични пътища и др. (113, 66). Множеството структурни и функционалните промени могат да се появят едновременно и да прогресират с различна скорост в диабетния бъбрек, което води до висока хетерогенност на заболяването. Въпреки че точната хронологична последователност от събития не е добре дефинирана, то причина за клиничните прояви на ДБЗ са както патогномоничните морфологични промени в гломерула (гломерулосклероза), така и тубулоинтерстициални увреждания [66, 102]. С оглед на това, за ранната диагностика на ДБЗ са необходими биомаркери с висока специфичност към различни аспекти на бъбречното

увреждане при ЗД II [206].

В естествения ход на бъбречното увреждане при ЗД II, повишението на ACR най-често е първият клиничен индикатор за наличие на ДБЗ [121]. Следователно, биомаркери, които корелират с албуминурията, са подходящи за откриване на ДБЗ. Тази констатация може да обясни и получените от нас резултати, че uNGAL и UNC имат необходимата диагностична надеждност в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II (ЗД без ДБЗ vs ЗД с ДБЗ). UNC показва по-добра диагностична ефективност от uNGAL в диагностициране на пациенти с ДБЗ, самостоятелното използване на маркера статистически значимо различава пациентите със ЗД II с бъбречно увреждане. В Таблица 41 са представени определените в проучването cut-off стойности за диагностициране на ДБЗ при лица със ЗД II (Табл. 41).

Таблица 41. Определените в настоящото проучване cut-off стойности за ДБЗ – ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60mL/min/1.73m²

Показател	Cut-off	Единици	ДЧ	ДС	LR+	LR-	ППС	ОПС	ДЕ
uNGAL	53.3	ng/ml	4	94%	7.64	0.58	92%	53%	65%
UNC - жени									
UNC - мъже									

Констатираната от нас полова зависимост в резултатите на UNC се цитира и от Fufaa GD). Те установяват медиана при жени 9.4 ng/mmol и при мъже 1.8 ng/mmol сред пациенти със ЗД II [77]. Тази полова диференциация в стойностите на UNC е възможно да се дължи на естроген-медирана експресия на NGAL в бъбречните тубули и/или на очакваните по-ниски концентрации на креатинин в урина при жени, в резултат на по-малката мускулна маса [154]. В нашето проучване кохортата мъже имат по-високи резултати за креатинин в урина от кохортата жени със ЗД II, с което може да се обяснят и по-високи резултати за UNC при жени в сравнение с мъже при пациентите със ЗД II. Но разликата между двата пола се оказва сигнификантна само при пациентите със ЗД II с нормална бъбречна функция и намалява паралелно с прогресията на бъбречното увреждане. С развитието и напредването на ДБЗ тубуларното увреждане, което причинява намалена реабсорбция или повишена експресия на NGAL става определящ фактор за концентрацията му в урина и за получените стойности на UNC. Всичко това намалява значението на половите различия в концентрацията на uNGAL и влиянието им върху резултатите за UNC.

3.2. NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД II

Съгласно насоките на KDIGO 2020, пациентите със ЗД II са класифицирани според тежестта и прогнозата на ДБЗ, спрямо стойностите на ACR и eGFR в 4 групи [109]. В зависимост от гликемичния контрол са формирани две подгрупи пациенти. Тъй като лошият

гликемичен контрол е основен фактор в развитието и прогресията на ДБЗ, е оценена връзката му с нивата на NGAL в плазма и урина. В Таблица 42 са представени медианите и интерквартилните обхвати на pNGAL, uNGAL и UNC в отделните подгрупи, посочени са групите, между които се установи статистически значима разлика в стойностите на оценяваните показатели (Табл. 42).

Таблица 42. Определените в настоящото проучване медиани на NGAL в кохортата - ЗД II

Категория	N (% от групата)	pNGAL(ng/ml) median (IQR)	uNGAL(ng/ml) median (IQR)	U median (IQR)
ЗД II (цялата кохорта)				
нисък риск			1	
умерен риск				
висок риск				
много висок риск				
добър контрол		8	2	3.98 (8.32)
лош контрол		7	32.40 (44.08)	4

сигнификантна разлика с групата с нисък риск, ²сигнификантна разлика с групата с умерен риск,

Стойностите на pNGAL, uNGAL и UNC нарастват прогресивно със степента на бъбречното увреждане, но тази разлика достига сигнификантна значимост само при резултатите на uNGAL и UNC. Стойностите на uNGAL и UNC в групата с нисък риск се различават статистически значимо със съответните им резултати във всички останали групи, разделени спрямо тежестта и прогнозата на ДБЗ (умерен, висок и много висок риск). Не се установи сигнификантна разлика в стойностите на pNGAL, uNGAL и UNC между групите с добър и лош гликемичен контрол.

Установи се статистически значима корелация между pNGAL и маркерите за оценка на гломерулната филтрация – позитивна с урея и креатинин в плазма и негативна с eGFR. uNGAL показва сигнификантна корелация с AER и ACR и отрицателна с eGFR. UNC корелира статистически значимо положително с AER, ACR и HbA1c и отрицателно с eGFR. Не се установи значима корелация и за трите маркера с показателите за оценка на метаболитния контрол.

Едновременното използване на двата маркера pNGAL и UNC демонстрира по-коректна оценка на прогнозата на ДБЗ, отколкото прилагането им самостоятелно, като и двата маркера са статистически значимо свързани с разпределението на пациентите по групи, спрямо тежестта на ДБЗ. Моделът, използващ pNGAL и UNC, е способен статистически значимо да дискриминира групите с ДБЗ и успешно прогнозира разпределението на 57% от пациентите

със ЗД II в съответните групи, спрямо степента на бъбречно увреждане и тяхната прогноза. При комбинираното приложение на двата маркера pNGAL и UNC успешно и статистически значимо се прогнозира наличието на ДБЗ с висок и много висок риск сред пациентите със ЗД II. Повишението на pNGAL с 1ng/mL увеличава шанса пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск с 1.01 пъти, а повишението на UNC с 1 µg/mmol увеличава вероятността пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск с 1.09 пъти (жени – 1.07 пъти, мъже – 1.14 пъти).

Данните в литературата посочват предиктивната роля на тубулоинтерстициалните лезии в прогресията на ДН. Okada T. et al. (2012) отбелязват, че интерстициалното възпаление и фиброза и тубуларната атрофия при пациенти с ДН са основни фактори, свързани с бъбречната прогноза и развитието на ТБН [148]. Mise K et al. (2015) доказват значението на IFTA-score за оценка на риска от прогресия на реналното увреждане при пациенти със ЗД . (2018) разработват система за стратификация на риска при пациенти с ДН, основана на характерните патоморфологични промени, която включва както гломерулни, така и тубулоинтерстициални лезии [95]. Това очертава ролята на тубуларни маркери като детерминанти за ранен спад на бъбречната функция при пациенти със ЗД. Редица клинични проучвания в различен модел оценяват ролята на NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ. Hwang S et al. (2017) изследват връзката между тъканната експресия на NGAL и KIM-1, както и хистопатологични и лабораторни параметри за бъбречната прогресия при пациенти с доказана ДН. Проучването установява, че IFTA-score положително корелира със спада на eGFR и констатира, че тубулоинтерстициалното увреждане е най-важната хистологична находка в прогресията на ДН. Те установяват, че тъканната експресия на NGAL и KIM-1 корелира отрицателно с eGFR, но само тъканната експресия на NGAL е независим предиктор за спад на eGFR [100]. Satirapoj B et al. (2016) констатира, че пациентите със ЗД тип II с по-високи нива на uNGAL имат по-бърз спад в бъбречната функция, UNC > 772 ng/g прогнозира спад на eGFR > 25% годишно, с AUC-ROC – 0.64. Те подчертават решаващата роля, която играе тубуларното увреждане в прогресията на ДБЗ и развитието му до терминален стадий Nowak N et al. (2018) оценяват изходните нива на гломерулни и тубуларни маркери свързани с ранен спад на бъбречната функция, проследявайки голяма кохорта пациенти със ЗД II с нормален eGFR за период от 5 – 12 г. Те констатира, че UNC е сигнификантно по-висок в групата с бърз спад на бъбречната функция, дефинирана като понижение на eGFR > 30% за период от 5 години, в сравнение с пациентите с по-нисък спад на eGFR [147].

Редица проучвания оценяват и връзката между лошия контрол на ЗД и развитието на ДБЗ, с нивата на NGAL. Al-Refai et al. (2014) установяват в кохорта пациенти със ЗД II положителна корелация между logUNC и HbA1c, регресионният анализ посочва HbA1c като независим

предиктор на съотношението $\log\text{UNC}$ [16]. Mahfouz MH et al. (2016) констатираат сигнификантна корелация между плазмените нива на NGAL с давността на диабета, систолното и диастолното кръвно налягане, HbA1c, HOMA-IR и триглицериди при пациенти със ЗД II. Те посочват лошия гликемичен контрол като основен фактор в развитието и прогресията на ДБЗ [126].

В препоръките на KDIGO 2020, eGFR и AER /ACR са основни критерии за стратификация на ДБЗ [109]. Следователно използването на един или няколко маркера, които корелират с промените и в двата показателя, ще постигне по-добра оценка на тежестта и прогнозата на ДБЗ. В съответствие на тази констатация са и резултатите от нашето проучване. Данните показват, че pNGAL корелира с понижението на гломерулната филтрация, а UNC с ACR, едновременното използване на резултатите за pNGAL и UNC сигнификантно прогнозира тежестта на ДБЗ, като pNGAL подобрява значимо прогностичната стойност на UNC в стратификацията на ДБЗ сред пациенти със ЗД II.

Group посочват, че дългосрочната кумулативна гликемична експозиция е основен рисков фактор за развитието на ДБЗ. По-високите нива на триглицериди и систолно кръвно налягане са също независими детерминанти за бъбречно увреждане при пациенти със ЗД [155]. В съответствие с тези данни в нашето проучване се констатира сигнификантна корелация между UNC и HbA1c, най-вероятно израз на по-тежко бъбречно увреждане при пациенти с лош гликемичен контрол. В обследваната от нас кохорта не се установи значима корелация между

3.3. NGAL маркер за диагноза и прогноза на ДБЗ при пациенти със ЗД I

За да оценим диагностичната надеждност на NGAL като маркер за ДБЗ при пациенти със

З

Д

I

,

в

при пациентите със ЗД I е изчислен с утвърдената формула Bedside Schwartz- $\text{GFR}_{(\text{Bedside Schwartz})}$ и алтернативната формула СКД-ЕPI40 - $\text{eGFR}_{(\text{СКД-ЕPI40})}$. Предпочетено е да се приложат и оценят и двете, тъй като формулата Bedside Schwartz е валидирана при деца с понижена гломерулна филтрация [168]. Извършения от нас регресионният анализ констатира много

о

р

т

а

т

добра зависимост между двете използвани формули и липса на статистически значима разлика при сравнение на резултатите.

Статистическата обработка на данните показва, че в цялата пациентска кохорта ЗД I единствено резултатите на UNC са сигнификантно по-високи в сравнение с контролната група деца. В таблица 43 са обобщени медианите и интерквартилните обхвати на pNGAL, uNGAL и UNC в отделните подгрупи пациенти със ЗД I, разделени спрямо стойностите на ACR, eGFR и HbA1c. Посочени са групите, между които има статистически значима разлика в стойностите на оценяваните показатели (Табл. 43).

Таблица 43. Определените в настоящото проучване медиани на NGAL в кохортата - ЗД I

Категория	N (% от групата)	pNGAL(ng/mL) median (IQR)	uNGAL(ng/mL) median (IQR)	
контролна група				
ЗД I (цялата кохорта)				
A1 (ACR < 3 g/mol)		57.75 (27.85)	12.00 (7.57) ³	1.64 (1.56) ³
A		66.50 (88.78)	41.4 (66.10) ^{1,2}	8.49 (12.82) ^{1,2}
≥ 90		56.50 (27.95)	12.35 (17.25)	2.00 (2.22)
		80.60 (80.00)	21.30 (15.93)	2.00 (7.20)
≥ 90		53.95 (25.67) ⁴	14.28 (23.32)	2.37 (3.83)
		77.10 (57.70) ⁵	12.00 (10.95)	1.90 (1.29)
добър контрол		59.00 (43.2)	12.00 (8.90)	1.71 (1.40) ⁷
лош контрол		54.90 (35.6)	16.10 (27.90)	2.79 (6.70) ^{1,6}

сигнификантна разлика със контролната група, ²сигнификантна разлика с A1, ³сигнификантна разлика с A2, сигнификантна разлика с eGFR_(CKD-EPI40) < 90, ⁵сигнификантна разлика с eGFR_(CKD-EPI40) ≥ 90, ⁶сигнификантна разлика с добър гликемичен контрол, ⁷сигнификантна разлика с лош гликемичен контрол

В настоящото проучване се констатира отрицателна корелация между pNGAL с двете използвани формули за изчисление на eGFR, но тя се оказва сигнификантна само с eGFR_{(CKD-сЪс ЗД I с eGFR_(CKD-EPI40) ≥ 90 mL/min/1.73 m² спрямо тези с eGFR_(CKD-EPI40) < 90 mL/min/1.73 пациенти с eGFR_(CKD-EPI40) ≥ 120 mL/min/1.73 m² не се формира група за оценка на гломерулната хиперферфилтрация, следователно не можем да оценим ролята на маркера в диагностиката на този ранен стадий на бъбречното увреждане при ЗД I. Допълнително смятаме, че анализът, използван в проучването има незадоволителни аналитични характеристики при определяне на ниски стойности на NGAL, следователно е неприложим}

за оценка на гломерулна хиперфилтрация, тъй като и здравите деца имат стойности на pNGAL под измервателния диапазон на метода (LLOQ). Но получените от нас резултати посочват възможната перспектива на маркера, но не и на анализа за оценка на стадия на гломерулна хиперфилтрация при пациенти със ЗД. В подкрепа на тази констатация са и данните от проучването на Fu WJ et al. (2012), които установяват сигнификантно по-ниски нива на pNGAL при пациенти със ЗД II с гломерулна хиперфилтрация в сравнение с контроли (12.0 vs по-висок клирънс на плазмения NGAL в този ранен стадий на бъбречно увреждане при ЗД NGAL между пациентите със ЗД I с eGFR > 135 mL/min/1.73 m², както спрямо пациентите със запазена гломерулна филтрация, така и спрямо контролната група (111.3 vs 129.5 vs 151.3 концентрацията на pNGAL, но посочват необходимостта от допълнителни проучвания, за да се потвърдят получените резултати [175].

Най-ранната проява на ДБЗ при ЗД I е гломерулната хиперфилтрация, дължаща се на аферентна артериоларна вазодилация в резултат на индуцираните от хипергликемията вазоактивни медиатори, но важна роля има и тубуларното увреждане, което потенцира ефекта на тубуларно-гломерулната обратна връзка [102, 193, 194]. „Златен стандарт“ в определянето на GFR е измерване клирънса на екзогенната субстанция инулин по време на непрекъсната интравенозна инфузия. Този метод е инвазивен, трудоемък и не се прилага в рутинната практика, това важи особено за педиатричната популация. Поради тази причина за определяне на GFR най-често се прилагат формули за изчисление, разчитащи на клирънса на ендогенни маркери, които се елиминират от организма изцяло чрез гломерулна филтрация изчисление на eGFR при деца. Тя включва концентрация на серумен креатинин, измерен с метод, проследим до ID-MS, и височината на изследваното лице. Формулата е валидирана при деца с ХБЗ с диапазон на GFR от 15 до 75 mL/min/1.73 m². Стойностите на eGFR, получени от тази формула, имат P30 ~ 80%, следователно има 80% шанс резултатите да бъдат в рамките на ± 30% от реалната GFR. Всичко това посочва ограниченията в използването на формулата стойности на GFR >120 mL/min/1.73 m² [129, 168]. Björk J et al. (2021) представят алтернативна формула, наречена СКД-ЕPI40. СКД-ЕPI40 е валидирана сред кохорта от 4005 деца и е базирана на уравнението СКД-ЕPI, но с коригиран спрямо възрастта и пола серумен креатинин към възрастта 40 години. В данните, изведени от Björk J et al. (2021), формулата

спрямо референтния измерен клирънс при деца с eGFR >75 mL/min/1.73m² [30]. Въпреки че резултатите са обещаващи, е необходимо да се натрупат допълнителни данни, за да се оцени клинична приложимостта на СКД-ЕРІ40 в различни педиатрични популации преди да влезе в рутинната практика. Изследването и валидирането на биомаркери, които се влияят от промени в гломерулната филтрация също представлява алтернатива при пациентите със ЗД І. NGAL е белтък с ниска молекулна маса, който се филтрира свободно през гломерулната филтрационна бариера, но в по-голяма част се реабсорбира в проксималните бъбречни каналчета [9, 153]. Следователно без съпътстващо тубуларно увреждане не би следвало да се очаква концентрацията на циркулиращия NGAL да отразява наличието на гломерулна хиперфилтрация. Но все повече данни сочат, че увредата на тубулите е първичното нарушение, инициращо бъбречна дисфункция при пациентите със ЗД [107, 116]. Описват се редица патоморфологични изменения в тубулоинтерстициума, които предхождат или съпътстват патогномоничните изменения в гломерула [181]. Следователно в ранния стадия на хиперфилтрация на реналното увреждане при ЗД може да се очаква нарушение и във функцията на проксималните тубули, което да доведе до ограничена реабсорбция на филтрирания NGAL. В тази хипотетична ситуация повишената GFR би довела до намаление на концентрацията на pNGAL, но паралелно с повишение на uNGAL.

По-голяма част от проучванията, проведени при пациенти със ЗД І, оценяват връзката на с промените в AER/ACR. В настоящото проучване не се установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между контролната група и кохортата със ЗД І, както и между пациентските групи разделени спрямо ACR. В контраст с тези резултати Paradoroulou-2017) установяват, че средните стойности на pNGAL в двете пациентски кохорти – деца и възрастни със ЗД І, се различават сигнификантно както помежду си (67.6 vs 85.2 ng/mL), така и със съответните им контролни групи (67.6 vs 24.6 ng/mL и 85.2 vs 76.1 ng/mL). Авторите определят pNGAL като биомаркер за бъбречна дисфункция, показващ отрицателна корелация с eGFR (p < 0.001) [152]. Zachwieja J et al. (2010) констатират сигнификантна разлика в средните стойности на pNGAL при деца със ЗД І с нормална AER спрямо контроли (867.4 vs). Авторите отбелязват, че нормалната AER при диабетици не изключва наличието на ДБЗ и посочват pNGAL като по-чувствителен маркер от AER за оценка на бъбречната функция при деца със ЗД [215]. В таблица 44 са представени средните стойности или медиани при пациенти със ЗД І, които се цитират в литература и получените резултати в настоящото проучване (Табл. 44).

Таблица 44. Средни стойности/медиани на pNGAL при пациенти със ЗД І

Проучване	Възраст КГ/ГГ	КГ	A1	A2	Единици		Метод
-----------	------------------	----	----	----	---------	--	-------

[Не	Не	
[Да	Не	
[Не	Да	
[Не	Да	
настоящо проучване						Не	Да	

липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$), ² липсва сигнификантна разлика между A2 и контролната група ($p > 0.05$), ³ липсва сигнификантна разлика между A2 и A1 ($p > 0.05$)

В настоящото проучване се установи, че в цялата кохорта ЗД I единствено стойностите на UNC са сигнификантно по-високи спрямо контролната група. Пациентите със ЗД I с повишен ACR имат статически значимо по-високи резултати за uNGAL и UNC, както спрямо контролната група, така и спрямо пациентите с нормален ACR. Пациентите с лош гликемичен контрол имат сигнификантно по-високи резултати за UNC както спрямо контролната група, така и спрямо тези с добър контрол на ЗД I.

Констатира се статистически значима положителна корелация между uNGAL с AER, ACR, HbA1c, BMI, триглицериди и между UNC с ACR, AER, HbA1c и триглицериди. Не се установи корелация между нито един от двата маркера с eGFR_(Bedside Schwartz) и eGFR_(CKD-EPI40).

ROC анализът демонстрира много добра диагностична ефективност на uNGAL и UNC в отдиференциране на пациенти със ЗД I с повишен ACR (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.836 и Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 47.85 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти с албуминурия сред децата със ЗД I е 86%. Диагностичната ефективност, с която стойност на UNC > 3.86 µg/mmol успява правилно да идентифицира пациенти с патологична албуминурия сред децата със ЗД I, е 89 %. UNC показва по-добра диагностична надеждност от uNGAL в диагностициране на пациенти със ЗД I с патологична албуминурия. Самостоятелното използване на UNC статистически значимо различава децата със ЗД I с ACR > 3 g/mol, като pNGAL не подобрява значимо тази прогностична стойност на маркера. Увеличението на UNC с 1 µg/mmol при пациент със ЗД I повишава 2.1 пъти вероятността лицето да има ACR > 3g/mol. Статистическата обработка на данните показва, че uNGAL и UNC са подходящи маркери за отдиференциране на пациенти с повишен ACR и следователно и за откриване на ДБЗ сред деца със ЗД I.

В съответствие с получените от нас резултати са и данните от литературните източници, посочващи предиктивната стойност на uNGAL и UNC в диагностиката на ДБЗ. Hafez MH et al. (2015) проучват ролята на uNGAL в диагностиката на ДБЗ при деца със ЗД I и посочват значимо по-високи резултати при пациенти с патологична албуминурия спрямо тези с нормална албуминурия и спрямо контролната група (39.14 vs 15.69 vs 5.66 ng/mL). Установена е сигнификантна корелация между стойностите на uNGAL и ACR ($p=0.001$), но не и с eGFR.

Определената от тях cut-off стойност на uNGAL е 11.75 ng/mL с AUC-ROC – 0.821 в разграничаване на пациенти със ЗД I с ACR > 3 g/mol (86). По-голяма част от проучванията, проведени при пациенти със ЗД I, оценяват ролята на маркера да диагностицира бъбречно увреждане при нормална AER/ACR, като изведените от тях cut-off стойности разграничават здравите деца от тези със ЗД I с нормоалбинурия. Zachwieja J et al. (2010) констатираат сигнификантна разлика в средните стойности на uNGAL при деца със ЗД I с нормална AER спрямо контроли (420.0 vs 156.5 ng/mL) (215). Ucakturk A et al. (2009) описват сигнификантна разлика в стойности на UNC между пациенти със ЗД I с нормална AER спрямо референтната група (33.0 vs 13.3 ng/mL), но не установяват значима корелация между UNC с AER и eGFR (Табл. 45, 46) [190].

Таблица 45. Средни стойности/медиани на uNGAL и UNC при пациенти със ЗД I

Проучване	Възраст КГ/ТГ	Показател	КГ	A1	A2	A3	Единици			Метод
[Да	Не	
[Да	Не	
Yildirim ZY								Да		
[Да	Не	
[
Настоящо проучване								Да	Не	
[Не	Не	
[Да (A3)		
Yildirim ZY								Не		
Настоящо проучване				1.64 ¹	8.49			Да	Не	

липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$), ²липсва сигнификантна разлика между A2 и A1 ($p > 0.05$), ³ липсва сигнификантна разлика между A3 и A2 ($p > 0.05$)

Съкращения: КГ – контролна група; A1-пациенти със ЗД с нормална AER/ACR; A2- пациенти със ЗД с умерено повишена AER/ACR; A3- пациенти със ЗД със силно повишена AER/ACR; +ACR –сигнификантна положителна корелация с AER/ACR ($p < 0.05$); -GFR - сигнификантна отрицателна корелация с GFR ($p < 0.05$).

Таблица 46. Диагностична ефективност на uNGAL и UNC в разграничаване на пациентите с сред лица със ЗД I

Проучване	показател	cut-off	единици	ДЧ	ДС	LR+	LR-	ППС	ОПС	ДЕ
[86]	uNGAL		ng/ml							
Kamel A, 2019 ^[105]	uNGAL	132.5	ng/ml	100%	63%	2.70	<0.01			

настоящо проучване	uNGAL		ng/ml	52%	100%	>52.0	0.48	100%	84%	86%
настоящо проучване	UNC	3.86		67%	98%	35.1	0.34	93%	88%	9%

ДЧ – диагностична чувствителност, ДС – диагностична специфичност, LR+ отношение на положителна вероятност, LR- отношение на отрицателна вероятност, ППС – положителната предсказваща стойност, ОПС – отрицателната предсказваща стойност, ДЕ – диагностична ефективност

В съответствие с получените от нас резултати за по-високи нива на UNC при пациенти с лош контрол на ЗД I са и данните от други проучвания [86, 175]. Hafez MH et al. (2015) докладват значима положителна корелация между uNGAL и продължителността на диабета, HbA1c и дислипидемията. Те обобщават, че uNGAL може да бъде полезен ранен биомаркер за ДБЗ при пациенти с неконтролиран и дългогодишен ЗД I [86]. Sołtysiak J et al. (2014) констатира значима разлика в стойностите на UNC между пациентите със ЗД I, разделени спрямо гликемичния контрол, като стойностите нарастват прогресивно в четирите групи от идеален до лош контрол. Те установяват сигнификантна корелация между UNC с HbA1c

Според критериите на KDIGO 2020 лабораторните маркери за ДБЗ са ACR > 3 g/mol и ЗД I се диагностицира най-често с неговата поява, което позволява по-добро диагностициране и проследяване на ДБЗ, като се препоръчва скринингът за ДБЗ да започне 5 години след поставяне на диагноза, чрез изследване на AER/ACR [17]. В естествения ход на бъбречното увреждане при ЗД I първият клиничен признак за бъбречно засягане, дължащ се на ЗД, е гломерулната хиперфилтрация, която е последвана от развитие на повишена албуминова екскреция. При пациенти със ЗД I рядко се констатира повишен AER през първите 5 години. След като е налице албуминурия, скоростта на гломерулна филтрация намалява прогресивно с променлива скорост [3, 8, 121]. Следователно биомаркери, които корелират с албуминурията, са подходящи за откриване на ДБЗ. Данни в нашето проучване показват, че маркерите uNGAL и UNC притежават необходимата диагностична ефективност за отдиференциране на пациентите с ACR > 3 g/mol сред лица със ЗД I. Това очертава обещаващата роля на uNGAL и UNC в диагностиката на ДБЗ сред пациентите със ЗД I (Табл. Констатира се, че стойностите на uNGAL и UNC корелират с тежестта на албуминовата екскреция (ACR) и с маркери оценяващи контрола на ЗД – HbA1c и триглицериди, следователно могат да бъдат и обещаващи маркери за оценка на риска от прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД I. В Таблица 47 са представени определените в настоящото проучване cut-off стойности за ДБЗ при пациенти със ЗД I (Табл. 47).

Таблица 47. Определените в настоящото проучване cut-off стойности за ДБЗ - ACR>3 g/mol при пациенти със ЗД I

Показател	Cut-off	Единици	ДЧ	ДС	LR+	LR-	ППС	ОПС	ДЕ
uNGAL		ng/ml	52%	100%	>52.0	0.48	100%	84%	86%
UNC			67%	98%	35.1	0.34	93%	88%	9%

В нашето проучване се констатира, че концентрацията на NGAL в урината е зависима и от

И
П
П

и
н
а
л
и
ч
и
е
т
о

н
а
л
е
в
к
о
ц
и

Резултати в настоящото проучване са в съответствие с данните в литературата, които представят NGAL като маркер с добър диагностичен профил в диагностиката на ДБЗ. Въпреки това възприетите от нас критерии за ДБЗ са промени в лабораторните показатели eGFR и ACR, следователно не можем да оценим ролята на NGAL като по-ранен маркер за настъпване на бъбречна дисфункция спрямо тези класически показатели за бъбречна увреда, както и ролята на NGAL като маркер за ДБЗ при пациенти с неалбуминуричен фенотип на ДБЗ. Необходимо е проследяване на подбрана кохорта от пациенти със ЗД с

и

нормоалбуминурия и нормална eGFR, за да се оцени прогностична стойност на NGAL като ранен маркер в развитието на ДБЗ и евентуалните му преимущество спрямо ACR и eGFR. Допълнително отчитаме редица ограничения и лимитиращи фактори, като аналитичните характеристики на анализа при определяне на ниски стойности на NGAL, възможната вариабилност в екскрецията на албумин, тъй като ACR е отчетен еднократно и не е потвърдена патологичната албуминурия и малкия брой пациенти със ЗД I с лабораторни данни за бъбречно увреждане.

VII. ИЗВОДИ

На основание извършения от нас анализ, ние формулираме следните изводи:

1. Данните от верифицирането на имунотурбидиметричен анализ за определяне на добри аналитични характеристики, отговарящи на националните и международни стандарти. Тестът демонстрира по-добра аналитична надеждност при определяне на

високи в сравнение с ниски концентрации на анализа и не успява да детектира с необходимата точност концентрации на NGAL < 12 ng/mL.

2. Представянето на резултатите за uNGAL като съотношение спрямо uCreatinine позволява по-добра сравнимост на резултатите, както и получаване на по-надеждни резултати при нестандартизирани условия за взимане на биологичен материал, като по този начин се постига компенсиране на вариациите от дневните колебания в осмоларитета на урината.
3. При определяне на референтните граници за българската популация при възрастни лица се очерта връзка между концентрацията на pNGAL и възрастта, която корелира с възрастово обусловените промени в eGFR.
4. При определяне на референтните граници за българската популация при възрастни лица се установи статистически значима разлика между двата пола в стойностите на стойности на креатинин в урина.
5. При пациентите със ЗД II без ДБЗ се установи статистически значима разлика в стойностите на UNC между двата пола. Жените имат по-високи резултати за UNC, което е паралелно на по-ниските стойности на креатинин в урина.
6. При пациентите със ЗД II концентрацията на pNGAL корелира с понижението на eGFR, докато промените в стойностите на uNGAL и UNC с повишението на ACR. Самостоятелното използване на pNGAL с добра диагностична ефективност отдиференцира пациентите със ЗД II с понижена гломерулна филтрация, а UNC с много добра ефективност тези с повишен ACR.
7. При пациенти със ЗД II се установи, че от трите оценявани показателя – pNGAL, uNGAL и UNC, с най-висока прогностична стойност за диагноза на ДБЗ са промените в стойностите на UNC. pNGAL не подобрява прогностичната стойност на UNC като маркер за диагноза на ДБЗ. Самостоятелното използване на полово диференцираните cut-off стойности на UNC статистически значимо и с много добра диагностична ефективност различава пациенти с бъбречно увреждане сред лица със ЗД II.
8. При пациенти със ЗД II се установи, че pNGAL подобрява прогностичната стойност на UNC при стадиране на ДБЗ. При отчитане на промените в стойностите на pNGAL и UNC се постига ефективна прогноза и стратификация на ДБЗ при пациенти със ЗД
9. При пациентите със ЗД I – деца, се констатира наличие на бъбречно увреждане при

малък брой пациенти, в съответствие с относително малката давност на ЗД I.

10. При пациентите със ЗД I концентрацията на pNGAL корелира с понижението на eGFR, докато промените в стойностите на uNGAL и UNC с повишението на ACR. Самостоятелното използване на UNC с много добра ефективност различава пациентите със ЗД I с повишен ACR.
11. При пациенти със ЗД I се установи, че от трите оценявани показателя – pNGAL, uNGAL и UNC, с най-висока прогностична стойност за диагноза на ДБЗ са промените в стойностите на UNC. pNGAL не подобрява значимо прогностичната стойност на UNC, като маркер за диагноза на ДБЗ. Самостоятелното използване на определената стойност на UNC статистически значимо и с много добра диагностична ефективност различава пациенти с бъбречно увреждане сред лица със ЗД I.
12. При пациенти със ЗД I се установи, че самостоятелното използване на UNC има добра прогностична стойност и най-добра клинична приложимост при прогноза и стадиране на ДБЗ.
13. При интерпретация на резултатите за uNGAL и UNC е необходимо да се отчита влиянието на ИПП и левкоцитурията.

VIII. ПРИНОСИ

Приноси с теоретичен характер

1. Потвърдена е високата аналитична надеждност на NGAL Test™ на фирма Bioporto при определяне концентрацията на NGAL в плазма и урина.
2. Установи се, че представянето на резултатите за uNGAL като съотношение спрямо позволява по-добра сравнимост на резултатите, както и получаване на по-надеждни резултати при използване на spot урина.

3. Установи се, че при лица без бъбречно увреждане, има полова зависимост в стойностите на UNC, което е свързано с половата разлика в концентрацията на креатинин в урина.
4. Установи се, че при пациенти със ЗД, концентрацията на pNGAL корелира с понижението на eGFR, докато промените в стойностите на uNGAL и UNC с повишението на ACR.
5. Установи се, че при пациенти със ЗД II, самостоятелното използване на UNC е ефективен маркер за диагноза на ДБЗ, а едновременното приложение на pNGAL и UNC за прогноза на ДБЗ.
6. Установи се, че при пациентите със ЗД I, самостоятелното използване на UNC е ефективен маркер за диагноза и прогноза на ДБЗ.
7. Установи се, че концентрацията на uNGAL е зависима и от ИПП и наличието на левкоцитурия.

Приноси с практико-приложен характер

1. За първи път в България е извършено аналитично верифициране на имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL
2. За първи път в България са определени полово диференцирани референтни граници на pNGAL, uNGAL и UNC при възрастни лица, определени чрез клинично приложимия имунотурбидиметричен анализ.
3. За първи път в България са определени референтни граници на pNGAL, uNGAL и UNC при деца, определени чрез клинично приложимия имунотурбидиметричен анализ.
4. За първи път в българска кохорта от пациенти със ЗД II е оценена прогностичната роля на NGAL като маркер за диагностика на ДБЗ. Определени са cut-off стойности, които могат да бъдат приложени в рутинната практика.
5. За първи път в българска кохорта от пациенти със ЗД II е оценена прогностичната роля на NGAL като маркер за прогноза на ДБЗ.
6. За първи път в българска кохорта от пациенти със ЗД I е оценена прогностичната роля на NGAL като маркер за диагностика на ДБЗ. Определени са cut-off стойности, които могат да бъдат приложени в рутинната практика.
7. За първи път в българска кохорта от пациенти със ЗД I е оценена прогностичната роля на NGAL като маркер за прогноза на ДБЗ.

IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

2. Шефкет С, Бочева Я. ПРЕДИКТИВНА РОЛЯ НА НЕУТРОФИЛ ГЕЛАТИНАЗА-АСОЦИИРАН ЛИПОКАЛИН КАТО РАНЕН МАРКЕР ЗА БЪБРЕЧНО УВРЕЖДАНЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ. Актуална нефрология. 2021. XV.1:51-61.
3. Шефкет С, Бочева Я. РЕФЕРЕНТНИ ГРАНИЦИ ЗА БЪЛГАРСКАТА ПОПУЛАЦИЯ НА НЕУТРОФИЛ ГЕЛАТИНАЗА-АСОЦИИРАН ЛИПОКАЛИН ИЗМЕРЕНИ ЧРЕЗ ИМУНОТУРБИДИМЕТРИЧЕН АНАЛИЗ. *Нефрология, диализа и трансплантация,*

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Х. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1

ДЕКЛАРАЦИЯ

за информирано съгласие за участие в проучване „Аналитична и диагностична надеждност на имунотурбидиметричния тест за NGAL в плазма и урина при пациенти с диабетна нефропатия“

Предварителна информация

Какво се цели с това изследване?

Неутрофилният гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) е протеин, специализиран в свързването и транспортирането на малки хидрофобни молекули-сидерофори. NGAL се очертава в клиничната и експериментална нефрология като един от най-обещаващите тубуларни биомаркери в диагностика на остра и хронични бъбречни заболявания. Проучванията през последните години определят водещата роля на NGAL в ранната

диагностика на диабетната нефропатия. Цел на настоящото проучване е въвеждането и верифицирането на имунотурбидиметричния тест за измерване NGAL и определяне на неговото клинично приложение в диагностиката на диабетната нефропатия.

На какви тестове и процедури ще бъде подложен по време на изследването?

1. Анкетен метод от проследяващия клиницист;
2. За целите на проучването ще бъде взета кръв, чрез стандартна венепункция и урина. С оглед минимална инвазивност това ще се извършва по време на рутинни проследяващи тестове.

Методите и използваните средства не пораждаат рискове за изследвания и не предполагат инциденти или усложнения, свързани с изследването.

Какви са очакваните ползи от това изследване?

- Въвеждане и верифицирането на имунотурбидиметричен тест за определяне на NGAL в плазма и урина.
- Извеждане на референтни стойности за NGAL, при възрастни и деца.
- Определяне ролята на NGAL в диагностиката на Диабетната нефропатия.
- Въвеждане на нов и ранен показател за Диабетна нефропатия.

Кой участва в екипа, който провежда изследването?

Доц. Д-р Яна Димитрова Бочева д.м., Катедра по обща медицина и клинична лаборатория, Медицински университет – Варна;

д-р Севим Ахмед Шефкет, Катедра по обща медицина и клинична лаборатория, Медицински университет – Варна.

Как да се свържа с изследователите?

Д-р Севим Шефкет

Катедра по обща медицина и клинична лаборатория –МУ Варна
Варна 9002, „Марин Дринов” 55

ДЕКЛАРАЦИЯ

Аз, долуподписаният (име, презиме, фамилия)

съм информиран, че:

1. Крайната цел на изследването, в което се включвам, е да способства за индивидуалното и обществено здраве и благополучие.
2. Изследването, в което се включвам, събира данни, които ще бъдат коректно използвани само за научни цели.
3. С предоставените от мен данни ще боравят само изследователите, ангажирани в проучването.
4. На публикуване подлежат само обобщени данни, несъдържащи персонална информация.

5. Нито един от тестовете не е физически или психически травмиращ и не уронващ личното ми достойнство.
6. Ако в хода на изследването почувствам, че с нещо се нарушават личните ми права, мога без никакви последствия за мен да се откажа от участие.

С подписа си удостоверявам, че след предварително запознаване с целта и методите на изследването доброволно се включвам в него.

Подпис на декларатора:

Приложение №2

ПРОУЧВАНЕ ЗА АНАЛИТИЧНА И ДИАГНОСТИЧНА НАДЕЖДНОСТ НА ИМУНОТУРБИДИМЕТРИЧНИЯ ТЕСТ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА NGAL В ПЛАЗМА И УРИНА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ДИАБЕТНАТА НЕФРОПАТИЯ

Информация за пациента

Неутрофилният гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) е протеин, специализиран в свързването и транспортирането на малки хидрофобни молекули-сидерофори. Той участва в желязо-медираните клетъчни отговори – пролиферация, диференциация и апоптоза. Биологичната му роля в бъбрека е свързана със запазване на функцията в отговор на патологични стимули. NGAL се очертава в клиничната и експериментална нефрология като един от най-обещаващите тубуларни биомаркери в диагностика на остра и хронични бъбречни заболявания. Проучванията през последните години определят водещата роля на NGAL в

ранната диагностика на диабетната нефропатия. Цел на настоящото проучване е въвеждането и верифицирането на имунотурбидиметричния тест за измерване NGAL и определяне на неговото клинично приложение в диагностиката на диабетната нефропатия.

1. Каква е целта на това проучване?

Цел на настоящото проучване е въвеждането и верифицирането на имунотурбидиметричния тест за измерване NGAL и определяне на неговото клинично приложение в диагностиката на диабетната нефропатия.

2. Защо съм избран точно аз?

В клиничното проучване участват лица със ЗД тип I, с 5-годишна давност и ЗД тип II от момента на поставяне на диагнозата.

3. Трябва ли да участвам?

Не сте задължен да участвате в това проучване и не трябва да изтъквате причина за нежеланието си. Вашето участие е изцяло доброволно. Вашето обичайно лечение няма да бъде по-лошо, ако решите да не участвате. Също така, ако се съгласите да участвате, впоследствие можете да промените решението си и да се оттеглите от проучването по всяко време, без да посочвате причина и това няма да повлияе бъдещото ви лечение и грижа за вас.

Ако решите да участвате, ще бъдете помолен да подпишете формуляра за съгласие по-долу. Ще получите копие от него, което да съхранявате у Вас.

4. Мога ли да прекратя участието си в проучването?

Можете да решите да прекратите участие по всяко време. Моля, обсъдете притесненията си с изследователя. Вашата медицинска грижа няма да бъде засегната по никакъв начин, ако решите да прекратите участието си.

5. Какво ще се случи с мен, ако се включа?

На лицата, включени в проучването, ще бъде взета кръв, чрез стандартна венепункция и урина. С оглед минимална инвазивност това ще се извършва по време на рутинните проследяващи тестове.

6. Какви са възможните рискове, ако участвам?

Не се предвиждат потенциални рискове.

7. Какви са възможните ползи, ако участвам?

Няма непосредствени или преки ползи за Вас, ако решите да участвате в това проучване. Но информацията, събрана от Вас би могла да подобри диагностиката и лечението на пациентите с диабетна нефропатия.

8. Какво да правя, ако имам въпроси относно този изследователски проект?

Изследователят ще се радва да отговори на въпросите, които може да имате относно проучването или за начина на провеждането му.

9. Участието ми в проучването ще бъде ли поверително?

Медицинската и личната информация за Вас ще остане строго поверителна според законите на страната. Никой, който не е свързан с това проучване, няма да има достъп до лични или медицински данни, които сме събрали за Вас.

10. Какво ще стане с резултатите от изследването?

Предвижда се резултатите от изследването да се публикуват в съответни медицински списания и представени пред здравни професионалисти с интереси в тази област. Няма да е възможно да бъдете идентифициран от публикуваните резултати, защото данните Ви ще бъдат обединени с данните от други пациенти и ще бъдат представени напълно

анонимно. Можете да поискате копие от всеки публикуван резултат от изследователя.

Благодарим Ви, че отделихте време да прочетете информацията за това проучване, с което се надяваме, че ще се подобри диагностиката и лечението на диабетната нефропатия.

Моля, попитайте изследователя, ако имате въпроси или искате повече информация за проучването.

Данните за връзка с изследователя:

Д-р Севим Шефкет

Катедра по обща медицина и клинична лаборатория – МУ – Варна

Варна 9002, „Марин Дринов” 55

XI. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Борисова АМ. Диабетна бъбречна болест. *Ендокринология* XXIV.2019; 4:179-183.
2. Боцова В, Сабри А, Костадинова Е, Елкина С, Петрова Ч. Неутрофилният гелатиназа-асоцииран липокалин /NGAL/ – нова възможност за ранна диагностика на остро бъбречно увреждане в детска възраст. *Педиатрия*. 2018; 3:10-14.
3. Василева Б. Морфологични и лабораторни особености при пациенти със Захарен диабет и Хронично бъбречно заболяване. Дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „доктор“. Медицински университет - София, 2020.
4. Георги К. Хормонална и функционална диагностика на ендокринните заболявания. София: Парадигма; 2013:325-330с.

5. Петкова М, Антонов К, Паскалев Е. Нови подходи за оценка на бъбречната функция при пациенти с хронични вирусни хепатити и различни степени на хронично бъбречно заболяване. *MEDINFO*.2019;11:20-23.
6. Петрова И, Александров Ал, Матеев Хр, Владимирова Г, Банкова Ал, Богов И и съавт. Изследване на остро бъбречно увреждане след коронарна ангиография с биомаркера неутрофил гелатиназа асоцииран липокалин. *Българска кардиология XXIV*.2018;3:46-55.
7. Стоянова Л, Стайкова С, Димова М, Маринова Е. NGAL/неутрофилен гелатиназа-асоцииран липокалин/-биомаркер за ранно бъбречно увреждане и прогресия на ХБЗ. *Наука Кардиология*. 2018;3:103-106.
8. Танкова Ц. *Захарен диабет*. София: Парадигма; 2013. 301-305с.
9. Христова Ж. и Цачев К. Нови структурни биомаркери за оценка на реналната функция и ранно диагностициране на остро бъбречно увреждане. *Медицински преглед*.2013;49:5-
10. Христова-Димитрова Ж. Аналитична надеждност на методи за определяне на NGAL, КИМ-1 и IL-18 в урина и клиничното им значение за ранна оценка на риска от развитие на остро бъбречно увреждане. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “доктор“, Медицински университет София, 2015.

164. Rybi-Szumińska A, Wasilewska A, Litwin M, Kułaga Z, Szumiński M. Paediatric normative

175. Sołtysiak J, Skowrońska B, Fichna P, Stankiewicz W, Lewandowska-Stachowiak M, Ostalska-

. Urinary TNF- α and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with

214. Yıldırım ZY, Nayır A, Yılmaz A, Gedikbaşı A, Bundak R. Neutrophil Gelatinase-Associated

220. Żyłka A, Gala-Błądzińska A, Dumnicka P, Ceranowicz P, Kuźniewski M, Gil K, et al. Is

221. Żyłka A, Dumnicka P, Kuśnierz-Cabala B, Gala-Błądzińska A, Ceranowicz P, Kucharz J, et al.