

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

Медицински факултет

**КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА
ИМУНОЛОГИЯ**

Д-р Росен Димитров Михайлов

ЦИСТАТИН С И АЛБУМИНУРИЯ ПРИ ХРОНИЧНИ БЪБРЕЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

**Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна
степен „ДОКТОР“**

Научна специалност: Клинична лаборатория

**Научен ръководител:
Доцент, д-р Благовеста Дишлянова, дм**

София 2015

Дисертационният труд съдържа общо 203 стандартни машинописни страници и е онагледен с 64 таблици (18 от обзора и 46 собствени резултати) и 26 фигури (13 в обзора и 13 собствени резултати).

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедрата по Клинична лаборатория и Клинична имунология при Медицинския факултет на Медицинския университет – София

Проучването се базира на общо 669 лица, от които 153 клинично здрави лица, 152 болни с диабет тип 2, 162 болни с диабет тип 2 с хипертония, 150 болни с есенциална хипертония и 52 болни с ХПБЗ

Дисертантът работи, като Началник Клинична лаборатория
УМБАЛ „Царица Йоанна ИСУЛ“ ЕАД

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 05.02.2015 от 14.00 часа в семинарната зала на ЦКЛ на открито заседание на научното жури.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

Медицински факултет

КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

ЦИСТАТИН С И АЛБУМИНУРИЯ ПРИ ХРОНИЧНИ БЪБРЕЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Доктор Росен Димитров Михайлов

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен“ДОКТОР“

Професионално направление – 7.1 Медицина
Област на висше образование – Здравеопазване и спорт
Научна специалност – 03.01.12 Клинична лаборатория

Научен ръководител:

Доц. д-р Благовеста Дишлянова, дм

Рецензенти:

Проф. д-р Камен Цачев, дмн
Доц. д-р Аделаида Русева, дм

София 2015

Научно жури**Председател:**

Проф. д-р Камен Цачев, дмн

Членове

Проф. д-р Елена Цветанова, дмн

Доц. д-р Аделаида Русева, дм

Доц. д-р Ася Станчева, дм

Доц. д-р Б. Дишлянова, дм

Материалите по защитата са на разположение в секретариата на Катедрата по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ, София, УМБАЛ „Александровска“, ул. Г.Софийски 1.

СЪДЪРЖАНИЕ

1	ВЪВЕДЕНИЕ	8
2	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	9
2.1	ЦЕЛ.....	9
2.2	ЗАДАЧИ.....	9
3	МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	10
3.1	АНКЕТЕН МЕТОД	10
3.2	КЛИНИЧЕН МЕТОД	10
3.3	ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	10
3.3.1	<i>Определяне на цистатин С.....</i>	<i>10</i>
3.3.2	<i>Определяне на албумина в урината</i>	<i>11</i>
3.3.3	<i>Определяне на общия белтък в урината</i>	<i>12</i>
3.3.4	<i>Определяне на останалите лабораторни показатели</i>	<i>12</i>
3.3.5	<i>Определяне на гломерулната филтрация.....</i>	<i>12</i>
3.4	СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ.....	13
4	РЕЗУЛТАТИ	16
4.1	РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ	16
4.2	РЕЗУЛТАТИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ.....	22
4.2.1	<i>Контроли (клинично здрави лица).....</i>	<i>22</i>
4.2.2	<i>Диабетици.....</i>	<i>27</i>
4.2.3	<i>Хипертоници</i>	<i>41</i>
4.2.4	<i>Диабетици с хипертония.....</i>	<i>51</i>
4.2.5	<i>Хронични първични бъбречни заболявания (ХПБЗ).....</i>	<i>61</i>
4.2.6	<i>Сравнителен анализ на отделните групи.....</i>	<i>70</i>
5	ИЗВОДИ	81
6	ПРИНОСИ	82
7	ПРЕПОРЪКИ	83
8	НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	84

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АУ	Албуминурия
АУ А1	Албуминурия А1 (нормална албуминурия)
АУ А2	Албуминурия А2 (микроалбуминурия)
АУ А3	Албуминурия А3 (макроалбуминурия)
БМ	Биомаркер
ГБМ	Гломерулна бариерна мембрана
ГФ	Гломерулна филтрация
ДАН	Диастолично артериално налягане
ДИ	Доверителен интервал
ДН	Диабетна нефропатия
КББ	Кръвно-бъбречна бариера
КН	Кръвно налягане
МММ	Малка молекулна маса
ОБ	Общ белтък в урината
ОБН	Остра бъбречна недостатъчност
ОБУ	Остра бъбречна увреда
САК	Съотношение албумин:креатинин
САН	Систолично артериално налягане
СОБК	Съотношение общ белтък:креатинин
ССЗ	Сърдечно-съдови заболявания
ТБН	Терминална бъбречна недостатъчност
ХБЗ	Хронично бъбречно заболяване
ХБН	Хронична бъбречна недостатъчност
ХПБЗ	Хронични първични бъбречни заболявания
АСЕ	Angiotensin-converting Enzyme
АСR	Albumin/Creatinin Ratio
АDА	American Diabetes Association
АDМА	Asymmetric Dimethylarginine
АKІ	Acute Kidney Injury
А1М	Alpha -1- microglobulin
АRВ	Angiotensin Receptor Blocker
АRФ	Acute Renal Failure
В2М	Beta-2-microglobulin
ВМІ	Body Mass Index
ВТР	Beta-trace protein
САР	College of American Pathologists
С&G	Cockroft and Gault (formule)
С,G,A	Cause, Glomerular Filtration Rate, Albuminuria
СКD	Chronic Kidney Disease
СКD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology (formule)
СКF	Chronic Kidney Failure

Ccr	Creatinine Clearance
Ccys	Cystatin C Clearance
CRD	Chronic Renal Disease
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESKD	End Stage Kidney Disease
FABP	Fatty-acid-bilding Protein
GFR	Glomerular Filtration Rate
IDMS	Isotope Dilution Mass Spectrometry
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IFCCLM	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IL-6	Interleukine 6
IL-18	Interleukine 18
IRC	Insuficientia Renalis Chronica
IRMM	Institute for Reference Material and Measurement
KDIGO	Kidney Diseas Improving Global Outcomes
K/DOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Iniciative or NKF KDOQI
KIM 1	Kidney Injury Molecule 1
L-FABP	Liver type Fatty Acid Bilding Protein
MDRD	Modification Diet of Renal Disease
NAG	N-acetyl-beta D-glucosaminidase
NGAL	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NIHCE	Natiolan Institute for Health and Clinical Excellence
NIST	National Institute of Standards and Technology
NKDEP	National Kidney Disease Education Program
NKF	National Kidney Foundation
NAP	Non-albumin Protein
PCR	Protein: Creatinine Ratio
PENIA	Particle enhanced Iimmuno-Nephelometric Assay
PER	Protein Excretion Rate
PETIA	Particle enhanced Immuno Turbidimetric Assay
RBP	Renal Bilding Protein
RR	Relative Risk
RF	Renal Failure
TGF-beta	Transforming Growth Factor-beta
THP	Tamm-Horsfall Protein/s
UAER	Urine Albumin Excretion Rate
WG – SCC	Working Group on Standartization of Cystatin C

1 ВЪВЕДЕНИЕ

Търсенето на биомаркери за оценка на бъбречната функция, които да са достатъчно специфични, чувствителни и подходящи за рутинно приложение, продължава повече от един век. Причина за това е, че в световен мащаб и у нас се наблюдава тенденция за увеличаване на бъбречните заболявания (БЗ), респективно - на хроничната бъбречна недостатъчност (ХБН).

Според по-нови данни хроничната бъбречна недостатъчност е етап от развитието на хроничното бъбречно заболяване (ХБЗ). Бъбречната недостатъчност е синдром с неефективни бъбречни функции - екскреторна, регулаторна (хомеостатична) и инкреторна (ендокринна). СЗО класифицира едно състояние като ХБЗ, когато гломерулната филтрация (ГФ) е $<60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, като е налице и албуминурия, и трае по-дълго от 3 месеца.

Лабораторната диагностика на бъбречните заболявания е неразделна част от диагностично-терапевтичния процес. Още преди век и половина протеинурията се свързва с бъбречни заболявания. Днес се знае, че албуминурията (респ. протеинурията) е биомаркер за увреждане на бъбреците, а цистатин С и креатининът - за ГФ. За оценка на ГФ се използват екзогенни и ендогенни биомаркери.

За да се приеме един показател за биомаркер, той трябва да отговаря на строго определени критерии. Най-често използваните екзогенни маркери от радиоизотопните са $^{51}\text{Cr-EDTA}$ $^{99\text{mTc-diethylenetriamine-pentaacetic acid}}$ и $^{125}\text{I-iothalamate}$, а от нерадиоизотопните - inulin и iohexol. Най- използваният ендогенен маркер от много години е креатининът. Освен многото предимства, креатининът има и недостатъци. Чрез него може да се надцени или подцени стойността на гломерулната филтрация. Затова през последното десетилетие се предлага един нов алтернативен биомаркер - цистатин С. Той е белтък, член на суперфамилията цистатини. Произвежда се от всички ядреноносни клетки в човешкото тяло. Концентрацията му в кръвта на даден индивид е доста постоянна. Филтрира се през гломерулите и се реабсорбира в проксималните тубули, без да се екскретира с урината. Затова теоретично се приема за почти „идеален“ биомаркер за оценка на гломерулната филтрация. Получените данни за него са все още непълни, а в отделни случаи – и противоречиви, особено що се отнася до влиянието на пол, възраст, тегло, тютюнопушене и раса върху референтните стойности. Използването на цистатин С самостоятелно или в комбинация с креатинина за оценка на гломерулната филтрация в момента е обект на много проучвания. У нас изследването на цистатина при бъбречно болни, диабетици, хипертоници и други е в своето начало и ние ще се опитаме да оценим ролята му в диагностиката главно на хроничните бъбречни заболявания.

Определянето само на ГФ не е достатъчно за оценка етапите на ХБЗ и неговата прогресия. Затова през 2013 г. е предложено включването и на албуминурията, като основен показател за увреждане на бъбреците.

2 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1 Цел

Цел на настоящата работа е да се въведе и верифицира за първи път у нас високоспецифичен, имунологичен, автоматизиран метод за определяне на новия за нашата страна биомаркер цистатин С, който да се сравни с креатинина по отношение на оценката, която дава за бъбречната функция, както и да се проучи ролята на албуминурията, класифицирана в категориите А1, А2 и А3 за оценка увреждането на бъбреците при хронично бъбречно заболяване в резултат на диабет, хипертония и първични бъбречни заболявания.

За постигане на поставената цел си поставихме следните задачи.

2.2 Задачи

1. Въвеждане и верифициране на специфичен имунологичен метод за определяне на цистатин С в кръвен серум (PETIA).

2. Въвеждане и верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на албумина в урината.

3. Класифициране на албуминурията, като А1, А2 и А3, като се заменят използваните досега микроалбуминурия и макроалбуминурия и се определят АCR и PCR в урината.

4. Сравнителна оценка на гломерулната филтрация при ХБЗ чрез прилагане на четири формули: MDRD с креатинин, СКD-EPI с креатинин, СКD-EPI с цистатин С и СКD-EPI с креатинин и цистатин С

5. Определяне референтните стойности на общо 20 показателя в кръвен серум и урина при 153 клинично здрави лица в това число и на цистатин С в кръвния серум и на албумина в урината, АCR, общ белтък и PCR.

4. Определяне на диагностичната надеждност на албуминурия А1, А2 и А3, на АCR и PCR за ХБЗ вследствие на диабет тип 2, есенциална хипертония и първични бъбречни заболявания

5. Определяне диагностичната надеждност на ГФ определена само с креатинин, само с цистатин С и с комбинация от креатинин и цистатин С за ХБЗ вследствие на диабет тип 2, есенциална хипертония и първични бъбречни заболявания.

3 МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За събиране на научната информация за използвани:

3.1 Анкетен метод

За подбор на изследваните лица е използван анкетният метод, което е отразено в картите за прием на пациенти. Данните са попълнени от лекуващите лекари.

3.2 Клиничен метод

При всички включени в проучването лица е проведен клиничен преглед преди и след извършените лабораторни и други изследвания (ЕКГ, кръвно налягане (КН)).

3.3 Лабораторни изследвания

При провеждане на всички лабораторни изследвания е спазвана добрата лабораторна практика.

3.3.1 Определяне на цистатин С

При избора на метод за определяне на даден показател са спазвани следните критерии:

- аналитични – с доказани в литературата аналитични характеристики: специфичност, чувствителност, точност, възпроизводимост и достоверност, с достатъчен за клинични цели линеен диапазон;

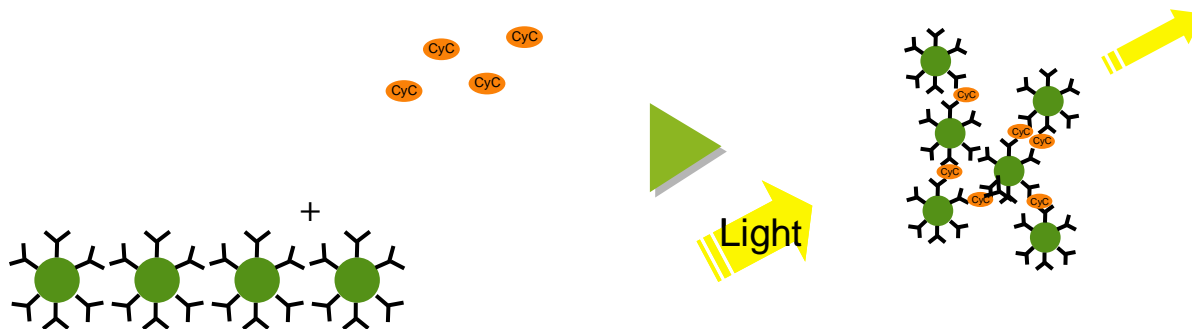
- диагностични - висока диагностична специфичност и чувствителност респ.точност

- икономически – приемлива себестойност на едно изследване или серия от изследвания

Използваните от нас методи отговарят на тези изисквания.

За определяне концентрацията на цистатин С в човешки серум е използван имунотурбидиметричният метод РЕТІА (particle-enhanced turbidimetric immunoassay) със системата Architect с8000.

а/ Принцип на метода - натоварени с античовешки цистатин С антитела латексови частички в буфера реагират с цистатин С в пробата, при което се формират антиген-антитяло комплекси, които се отчитат (фиг. 1).



Фигура 1: Принцип на реакцията

б/ Реактиви - Sentinel CH.SpA, разработен за Abbott Laboratories Diagnostics. Китът е от два реактива:

- Реактив 1. Трис-буфер 100 mmol/l с рН 8.5, съдържащ 2.5% пречистен серумен протеин за блокиране на заешките протеини;

- Реактив 2. Глицинов буфер 170 mmol/l с рН 7.3, съдържащ поликлонални заешки анти-цистатин С антитела, абсорбирани върху латексови частици, с концентрация 0.09%, стабилизирани посредством 0.1% натриев азид. Препоръчаната от производителя стабилност на кита е 45 дни на борда на апарата, за 24 часа работен режим и отворени опаковки.

в/ Материал – серум, който е стабилен при 20 - 25°C - 2 дена; при 2-8 °C - 7 дена; при -20°C - 1 месец;

г/ За стандартизация се използва MULTIGENT Cystatin C Calibrator, който е човешки серум с рекомбинантен цистатин С, стабилизирани с 0.09% натриев азид. Този стандарт е съпоставим и проследим спрямо European Reference Material ERM-DA471/IFCC. Калибрационната крива е 6-точкова. Стабилността на калибратора след отваряне е 60 дена;

д/ Контроли на две нива от 0.72 до 0.98 mg/l, средно 0.85mg/l, и от 3.46 до 4.68 mg/l, средно 4.07 mg/l;

е/ Техника – процедурата с Architect с8000 е напълно автоматизирана.

3.3.2 Определяне на албумина в урината

Албуминът в урината се определя с имунотурбидиметричен метод с тест Multigent microalbumin assay на фирмата Abbott Laboratories Diagnostics, със системата Architect с8000.

а/ Принцип на метода – имунотурбидиметрия с поликлонални антитела срещу човешки албумин. Съдържащият се в урината албумин реагира с човешките анти-албуминови антитела от реактива и по получените комплекси антиген-антитяло се отчита концентрацията. Концентрацията на антиген-антитяло комплексите е пропорционална на албумина в урината.

б/ Реактиви – 1. Good`s буфер 1.03%, натриев хлорид 0.17% и натриев хидроксид <0.14%; 2. Tris буфер -1.17%, човешки анти-албумин антитела - 0.17%, натриев хлорид - 0.17% и натриев хидроксид <0.9%;

в/ Калибратор – Multigent microalbumin calibrator в концентрации 5, 25, 100, 300 и 500 mg/l;

г/ Контроли - Multigent microalbumin controls с човешки серумен албумин на две нива в концентрации от 20 до 40 и от 75 до 105 mg/l;

д/ Техника - процедурата с Architect с8000 е напълно автоматизирана.

3.3.3 Определяне на общия белтък в урината

Общият белтък в урината се определя турбидиметрично чрез денатуриране на белтъците с бензетонин хлорид с тест Urine/CSG Protein на фирмата Abbott Laboratories Diagnostics със системата Architect с8000.

а/ Принцип на метода - преципитираните белтъци се отчитат при 404 nm. Съдържащите се в урината протеини са пропорционални на формираната суспензия;

б/ Реактиви – 1. Карбонатен буфер - 100 mmol/l и натриев хлорид - 140 mmol/l, 2. Бензетонин хлорид - 20g/l;

в/ Калибратор – използвана е четириточкова калибрация, Urine/CSF Protein Calibrator 100mg/l, 200mg/l, 400mg/l, 2000mg/l;

г/ Контроли – Lyphochek Quantitative Urine Control;

д/ Материал – използвана е еднократна порция урина;

е/ Техника - процедурата с Architect с8000 е напълно автоматизирана.

3.3.4 Определяне на останалите лабораторни показатели

а/ Урина - общо рутинно изследване с визуално отчитане и микроскопско изследване на седимента;

б/ Пълна кръвна картина с пет параметъра диференциално броене с хематологичен анализатор CD3500 Abbott Diagnostics.

в/ Глюкоза – хексокиназен метод; уреен азот – кинетичен GLD-NADH метод; пикочна киселина – с уриказен метод; общ холестерол – с ензимен метод; HDL и LDL – директни методи; триглицериди – ензимен метод; АСАТ и АЛАТ – IFCC методи; алкална фосфатаза - с pNPP.

Анализът на всеки един от тези лабораторни показатели се осъществява автоматично чрез системата Architect с8000 и оригинални реактиви на фирмата Abbott Laboratories Diagnostics. За калибриране се използват съответни стандарти, а за контролиране - съответните контроли на две нива. HbA1c – йонообменна хроматография с анализатор DS5, Drew Scientific.

3.3.5 Определяне на гломерулната филтрация

ГФ се определя като се използва концентрацията на серумния цистатин С, концентрацията на серумния креатинин и комбинация от двата биомаркера. От предлаганите и използвани многобройни формули за оценка на ГФ предпочетохме следните:

а/ **MDRD само с креатинин**

$eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 175 \times (sCR)^{-1, 154} \times (\text{възраст})^{-0, 203} \times 0,742$ (ако изследваният пациент е жена)

б/ СКД-ЕРІ само с креатинин

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 144 \times (sCr/0.7)^{-0.329} \times (0.993)^{age}$ (за жени с креатинин ≤ 0.7)

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 144 \times (sCr/0.7)^{-1.209} \times (0.993)^{age}$ (за жени с креат. > 0.7)

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 141 \times (sCr/0.9)^{-0.411} \times (0.996)^{age}$ (за мъже с креатинин ≤ 0.9)

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 141 \times (sCr/0.9)^{-1.209} \times (0.996)^{age}$ (за мъже с креатинин > 0.9)

в/ СКД-ЕРІ само с цистатин С (за мъже и жени) с цистатин С ≤ 0.8

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 133 \times (sCys/0.8)^{-0.499} \times (0.993)^{age} \times 0.932$ (за жени с цистатин С ≤ 0.8)

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 133 \times (sCys/0.8)^{-1.328} \times (0.993)^{age} \times 0.932$ (за мъже с цистатин С ≤ 0.8)

г/ СКД-ЕРІ с креатинин и цистатин С

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 130 \times (sCr/0.7)^{-0.248} \times (sCys/0.8)^{-0.375} \times 0.995^{age}$ (за жени с креатинин ≤ 0.7 и цистатин С ≤ 0.8)

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 130 \times (sCr/0.7)^{-0.248} \times (sCys/0.8)^{-0.711} \times 0.995^{age}$ (за жени с креатинин > 0.7 и цистатин С > 0.8)

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 135 \times (sCr/0.9)^{-0.207} \times (sCys/0.8)^{-0.375} \times 0.995^{age}$ (за мъже с креатинин ≤ 0.9 и цистатин С ≤ 0.8)

- $eGFR \text{ (mL/min/1.73 m}^2) = 135 \times (sCr/0.9)^{-0.207} \times (sCys/0.8)^{-0.711} \times 0.995^{age}$ (за мъже с креатинин > 0.9 и цистатин С > 0.8)

Спряхме се на тези формули от 2009 г. и 2012 г., защото те се препоръчват от NKF и KDOQI и чрез тях се получават най-приемливи стойности за ГФ, оценена чрез ендогенни маркери (92, 164).

3.4 Статистически методи

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет SPSS 13.0. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе избрано $p < 0,05$.

Бяха приложени следните методи:

1. **Дескриптивен анализ** – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.

2. **Вариационен анализ** – за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическо разсейване.

3. **Графичен анализ** – за визуализация на получените резултати.

4. **Непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк** – за проверка на разпределението за нормалност.

5. **Т-критерий на Стюдънт** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

6. **Непараметричен тест на Ман-Уитни** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

7. **Корелационен анализ** – за проверка наличието на линейна зависимост между количествени данни.

8. **ROC крива** – за определяне праговата стойност на количествените признаци.

9. **Критерии за валидизация на скрининг тестове**

За оценяване **валидността** на скринирация (диагностициращия) тест се използват следните критерии:

- Чувствителност;
- Специфичност;
- Положителна предсказваща стойност;
- Отрицателна предсказваща стойност;
- Точност (% на верните отговори).

Резултати от теста	Със заболяване	Без заболяване	Общо
Положителен	a истински положителни	b фалшиво положителни	a+b
Отрицателен	c фалшиво отрицателни	d истински отрицателни	c+d
Общо	a+c	b+d	a+b+c+d

Чувствителността (Sensitivity) представлява способността на теста да открива лицата със заболяване. Измерва се с вероятността за позитивен тест при скринираните болни лица:

$$Se = \frac{a}{a + c}$$

Специфичността (Specificity) характеризира способността на теста да открива здравите лица. Измерва се с вероятността за отрицателен тест при скринираните здрави лица:

$$Sp = \frac{d}{b + d}$$

Положителната предсказваща стойност (Positive predictive value) на теста се измерва с вероятността за наличие на заболяване при лицата с положителен тест:

$$PV = \frac{a}{a + b}$$

Отрицателната предсказваща стойност (Negative predictive value) на теста се измерва с вероятността за отсъствие на заболяване при лицата с отрицателен тест:

$$NV = \frac{d}{c + d}$$

Точност (Accuracy) – относителен дял на верните отговори:

$$Ac = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

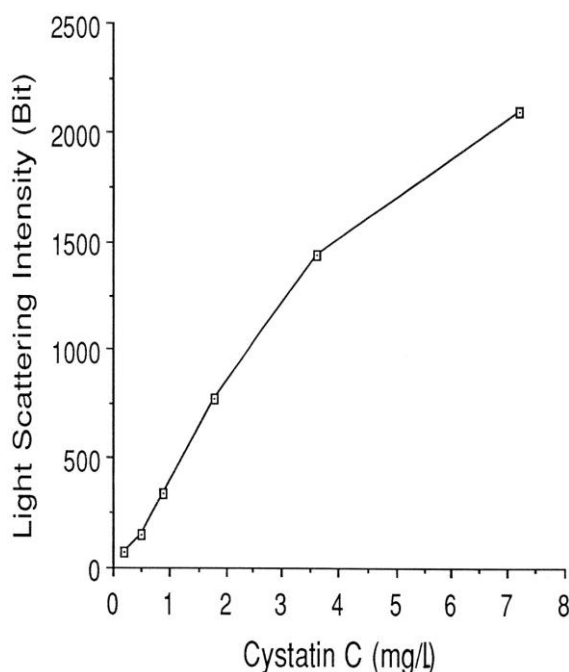
РЕЗУЛТАТИ

3.5 Резултати от използваните методи

Съгласно изискванията на Института за клинични и лабораторни стандарти на САЩ –CLSI Document EP 5 –A2 при прилагане на платформа и реактиви на производителя е необходимо методът да бъде верифициран, като бъдат потвърдени следните аналитични характеристики, обявени от производителя: аналитична измервана област (линейност), възпроизводимост, точност, достоверност и референтни граници

Верифициране на метода РЕТІА за определяне на цистатин С в кръвен серум.

а/ Калибрационна крива. Резултатите за цистатин С се отчитат по 6-точкова калибрационна крива с концентрации на 0,4 mg/l; 1.2 mg/l; 2.4 mg/l; 4,8 mg/l; 8,0 mg/l. Разреждането се осъществява с 0.9% натриев хлорид. Всяка точка е определена трикратно (фиг. 2).



Фигура 2: Шест точкова калибрационна крива за цистатин С

б/ Линейност. За определяне на линейността използваме проба с концентрация на систатин С 4.8 mg/l, която разреждаме с 0.9% натриев хлорид за да се получи 75%, 50%, 25%, 10% от стойността на неразредената проба. Така получените резултати са сравнени с Т-тест. Методът остава линеен в границите от 0.4 до 4,8 mg/l.

в/ Невъзпроизводимост.

В рамките на един ден са анализирани по 20 контроли от три концентрационни нива (0.60, 0.88 и 1.13 mg/l), които са оценени по съответните калибрационни криви. Резултатите са представени в таблица 1.

За всички контроли неточността (в таблицата отбелязана като *d*, %), изчислена чрез сравняване на съответните получени стойности с номиналните концентрации, отговаря на възприетите критерии и изисквания.

Представените данни показват, че точността и възпроизводимостта в непрекъснатата серия на метода са в границите на приемливост на резултатите. Недостоверността на метода, изразена като отклонение на средната стойност на контролите от номиналната им стойност, също е в приемливите граници.

Таблица 1: Точност и възпроизводимост в непрекъснатата серия за имунотурбидиметричен метод (PЕTIA) за определяне на цистатин С

	Level 1		Level 2		Level 3	
	0.60 mg/l	<i>d</i> %	0.88 mg/l	<i>d</i> %	1.13 mg/l	<i>d</i> %
	0.56	-6.67	0.89	1.14	1.12	-0.88
	0.58	-3.33	0.88	0.00	1.13	0.00
	0.57	-5.00	0.84	-4.55	1.15	1.77
	0.61	1.67	0.90	2.27	1.10	-2.65
	0.59	-1.67	0.88	0.00	1.14	0.88
	0.63	5.00	0.91	3.41	1.12	-0.88
	0.63	5.00	0.90	2.27	1.13	0.00
	0.65	8.33	0.92	4.55	1.12	-0.88
	0.58	-3.33	0.89	1.14	1.13	0.00
	0.60	0.00	0.87	-1.14	1.12	-0.88
	0.61	1.67	0.90	2.27	1.13	0.00
	0.58	-3.33	0.88	0.00	1.12	-0.88
	0.60	0.00	0.88	0.00	1.05	-7.08
	0.61	1.67	0.89	1.14	1.10	-2.65
	0.63	5.00	0.85	-3.41	1.19	5.31
	0.59	-1.67	0.88	0.00	1.13	0.00
	0.60	0.00	0.86	-2.27	1.15	1.77
	0.61	1.67	0.84	-4.55	1.12	-0.88
	0.58	-3.33	0.92	4.55	1.13	0.00
	0.59	-1.67	0.90	2.27	1.15	1.77
\bar{X}	0.600	0.00 (достоверност)	0.884	0.45 (достоверност)	1.127	-0.31 (достоверност)
SD	0.0229		0.0233		0.0266	
CV, %	3.82		2.63		2.36	

Точност и възпроизводимост във времето

В рамките на 20 дни са анализирани по една контрола от три концентрационни нива (0.60, 0.88 и 1.13 mg/l), които са оценени по съответните калибрационни криви. Получените резултати са представени в таблица 2.

Таблица 2: Точност и възпроизводимост във времето за имунотурбидиметричен метод (PETIA) за определяне на цистатин С

Ден No.	Level 1		Level 2		Level 3	
	0.60 mg/l	d %	0.88 mg/l	d %	1.13 mg/l	d %
1	0.55	-8.33	0.88	0.00	1.13	0.00
2	0.56	-6.67	0.87	-1.14	1.14	0.88
3	0.62	3.33	0.83	-5.68	1.15	1.77
4	0.66	10.00	0.90	2.27	1.11	-1.77
5	0.64	6.67	0.87	-1.14	1.15	1.77
6	0.58	-3.33	0.92	4.55	1.12	-0.88
7	0.64	6.67	0.90	2.27	1.13	0.00
8	0.66	10.00	0.93	5.68	1.13	0.00
9	0.58	-3.33	0.91	3.41	1.13	0.00
10	0.60	0.00	0.89	1.14	1.14	0.88
11	0.62	3.33	0.90	2.27	1.13	0.00
12	0.57	-5.00	0.87	-1.14	1.10	-2.65
13	0.60	0.00	0.87	-1.14	1.09	-3.54
14	0.62	3.33	0.91	3.41	1.05	-7.08
15	0.63	5.00	0.88	0.00	1.02	-9.73
16	0.62	3.33	0.84	-4.55	1.13	0.00
17	0.60	0.00	0.85	-3.41	1.15	1.77
18	0.63	5.00	0.83	-5.68	1.12	-0.88
19	0.57	-5.00	0.93	5.68	1.13	0.00
20	0.59	-1.67	0.90	2.27	1.16	2.65
\bar{X}	0.607	1.17 (достоверност)	0.884	0.45 (достоверност)	1.121	-0.84 (достоверност)
SD	0.0321		0.0305		0.0341	
CV, %	5.29		3.45		3.04	

За всички контроли точността (в таблицата отбелязана като d %), изчислена чрез сравняване на съответните стойности с номиналните концентрации отговаря на възприетите критерии и изисквания.

Представените данни показват, че точността и възпроизводимостта във времето на метода са в границите на приемливост на резултатите. Достоверността на метода, изразена като отклонение на средната стойност на контролите от номиналната им стойност, също е в приемливите граници.

г/ Аналитична чувствителност. Калибратор с позната концентрация (ниска нормална и средна) се добавя към проби, чията цистатинова концентрация е предварително определена. След добавяне на калибратора пробите се изследват повторно. Процентът на откриваемост се изчислява като отношение между измерена и добавена концентрация и варира между 95-101%.

Верифициране на имунотурбидиметричния метод за албумин в урината

а/ Калибрационна крива. Резултатите за албумин в урината се отчитат по 6-точкова калибрационна крива с концентрации на 5 mg/l; 25 mg/l; 100 mg/l; 300 mg/l; 500 mg/l. Използват се готови калибратори (фиг. 3).



Фигура 3: Калибрационна крива за албумин в урината

б/ Линейност. За определяне на линейността използваме проба с концентрация на албумин 500 mg/l, която разреждаме с 0.9% натриев хлорид за да се получи 75%, 50%, 25%, 10%, 5% от стойността на нерзаредената проба. Така получените резултати са сравнение с Т-тест. Методът остава линеен в границите от 5.0 до 500 mg/l.

в/ Невъзпроизводимост.

Точност и възпроизводимост в непрекъснатата серия

В рамките на един ден са анализирани по 22 контроли от две концентрационни нива (30.0 и 90.0 mg/l), които са оценени по съответните калибрационни криви. Резултатите са представени в таблица 3.

За всички контроли точността (в таблицата отбелязана като d, %), изчислена чрез сравняване на съответните получени стойности с номиналните концентрации, отговаря на възприетите критерии и изисквания.

Представените данни показват, че точността и възпроизводимостта в непрекъснатата серия на метода са в границите на приемливост на резултатите. Достоверността на метода, изразена като отклонение на средната стойност на контролите от номиналната им стойност, също е в приемливите граници.

Таблица 3: Точност и възпроизводимост в непрекъснатата серия за имунотурбидиметричен метод (PЕTIA) за определяне на микроалбумин

	Control 1		Control 2	
	30.0 mg/l	d %	90.0 mg/l	d %
1	30	0.00	92	2.22
2	31	3.33	91	1.11
3	29	-3.33	92	2.22
4	29	-3.33	92	2.22
5	28	-6.67	92	2.22
6	32	6.67	89	-1.11
7	34	13.33	88	-2.22
8	31	3.33	91	1.11
9	29	-3.33	88	-2.22
10	31	3.33	90	0.00
11	33	10.00	91	1.11
12	30	0.00	93	3.33
13	29	-3.33	91	1.11
14	30	0.00	88	-2.22
15	29	-3.33	92	2.22
16	28	-6.67	93	3.33
17	30	0.00	91	1.11
18	30	0.00	86	-4.44
19	28	-6.67	89	-1.11
20	31	3.33	90	0.00
21	33	10.00	93	3.33
22	32	6.67	91	1.11
\bar{X}	30.32	1.06	90.59	0.66

	(достоверност)	(достоверност)
SD	1.701	1.894
CV, %	5.61	2.09

Точност и възпроизводимост във времето

В рамките на 22 дни са анализирани по една контрола от две концентрационни нива (30.0 и 90.0 mg/l), които са оценени по съответните калибрационни криви. Получените резултати са представени в таблица 4.

Таблица 4: Точност и възпроизводимост във времето за имунотурбидиметричен метод (PЕTIA) за определяне на микроалбумин

Ден	Control 1 (прицелна стойност)		Control 2 (прицелна стойност)	
	30.0 mg/l	d %	90.0 mg/l	d %
1	35	16.67	95	5.56
2	31	3.33	91	1.11
3	29	-3.33	100	11.11
4	29	-3.33	92	2.22
5	28	-6.67	89	-1.11
6	32	6.67	100	11.11
7	35	16.67	87	-3.33
8	32	6.67	89	-1.11
9	28	-6.67	93	3.33
10	32	6.67	89	-1.11
11	35	16.67	90	0.00
12	30	0.00	100	11.11
13	37	23.33	92	2.22
14	35	16.67	85	-5.56
15	25	-16.67	102	13.33
16	37	23.33	95	5.56
17	37	23.33	94	4.44
18	31	3.33	85	-5.56
19	27	-10.00	86	-4.44
20	25	-16.67	90	0.00
21	24	-20.00	89	-1.11
22	32	6.67	91	1.11
\bar{X}	31.18	3.94	92.00	2.22

	(достоверност)	(достоверност)
SD	4.019	4.976
CV, %	12.89	5.41

За всички контроли точността (в таблицата отбелязана като d %), изчислена чрез сравняване на съответните получени стойности с номиналните концентрации, отговаря на възприетите критерии и изисквания.

Представените данни показват, че точността и възпроизводимостта във времето на метода са в границите на приемливост на резултатите. Достоверността на метода, изразена като отклонение на средната стойност на контролите от номиналната им стойност, също е в приемливите граници

3.6 Резултати на изследваните пациенти

3.6.1 Контроли (клинично здрави лица)

Данните от изследваните 153 контроли по отношение на възраст и антропометрични характеристики са представени в таблица 5.

Средната възраст на контролите е 44,53 в интервал от 20 до 77 години, средно тегло 65,74 кг., ръст 165,81 см. и BMI 23,91. Изследваните показатели са представени в таблица 6 и корелационните коефициенти на таблица 7. Концентрацията на цистатин С е в границите от 0,50 до 1,02, $\bar{X} = 0,74$ mg/l, а тази на албумина в урината от 5 до 22 mg/l, средно 12,92 mg/l. Тази концентрация на албумина се включва в рамките на албуминурия А1. Процентът на албумина от общия белтък е 26,14 с максимум до 68,18. Както се очаква, албуминът е само част от общия белтък, а останалите са други нискомолекулни белтъци, тубулни белтъци и тъканни белтъци (Tamm-Horsfall proteins). Протеинурията средно е 54,39 mg/l, като максималната стойност достига 109 mg/l. Средните стойности на ACR и PCR са съответно 2,47 и 10,50.

Таблица 5 : Вариационен анализ на изследвания контингент по възраст и антропометрични характеристики

Група	Възраст (години)		Възраст мъже (год.)		Възраст жени (год.)		Тегло (кг.)		Ръст (см.)		BMI (kg/m ²)	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Контролна	44,53	14,32	47,11	16,02	42,72	12,77	65,74	10,94	165,81	7,82	23,91	3,66

Таблица 6: Вариационен анализ на изследваните показатели в контролната група

Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Цистатин С (mg/L)	153	0,74	0,11	0,73	0,50	1,02
Креатинин в урината (mmol/L)	151	7,85	5,24	6,07	0,65	21,41
Албумин в урината (mg/L)	153	12,92	4,05	13,00	5,00	22,00
Общ белтък в урина (mg/L)	152	54,39	19,24	54,50	16,00	109,00
Процент на албумина от общия белтък в урината (%)	152	26,14	11,85	23,08	6,85	68,18
ACR (mg/mmol)	151	2,47	1,91	2,01	0,33	9,32
PCR (mg/mmol)	151	10,50	8,74	8,20	1,87	53,27
Холестерол (mmol/L)	153	4,72	0,60	4,89	3,21	5,99
Триглицериди (mmol/L)	153	1,32	0,37	1,31	0,55	2,00
HDL – С (mmol/L)	153	1,15	0,16	1,13	0,85	1,79
LDL – С (mmol/L)	153	2,62	0,44	2,71	1,14	3,65
Глюкоза (mmol/L)	153	4,93	0,73	5,12	3,06	6,33
Гликиран хемоглобин (%)	153	5,37	0,44	5,33	4,21	6,32
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	151	83,47	15,44	80,00	56,00	120,00
Пикочна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	153	256,92	84,57	251,00	56,00	430,00
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	151	76,24	14,15	72,36	59,12	132,33
eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	151	84,82	15,29	81,27	54,94	129,42
eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	153	109,81	15,05	111,31	70,55	139,88
eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	151	97,52	13,20	96,09	63,56	137,95

Таблица 7: Корелационни коефициенти между гломерулната филтрация и показателите креатинин, цистатин С, албумин в урината и ACR

Показатели	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (CKD-EPI) само с креатинин	eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С	eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	-0,679***	-0,686***	0,139	-0,360***
Цистатин С (mg/L)	-0,108	-0,148	-0,891***	-0,688***
Албумин в урината (mg/L)	0,065	0,077	-0,122	-0,002
ACR (mg/mmol)	0,101	0,082	-0,111	0,013

*** - $p < 0,001$

Гломерулната филтрация е близка при определяне с различните осъвременени формули (табл. 6), но най-приемлива е тази, определена с комбинацията цистатин С и креатинин ($97,52 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) и съобразена с възрастта и пола. Най-висока е ГФ, изчислена само с цистатин С - $109,81 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ и най-ниска - само с креатинин по формулата MDRD - $76,24 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Серумният цистатин С и креатинин корелират обратнопропорционално с ГФ в различна степен с показател за значимост $p < 0,05$. Референтните стойности съгласно персантилния анализ (0,025 и 0,975) на основните показатели (цистатин С, албумин и АСР) са демонстрирани на таблица 8.

Таблица 8: Референтни стойности на показателите цистатин С, албумин в урината и АСР

Показател	Пол	Персантили	Граници	95% ДИ	
				Долна граница	Горна граница
Цистатин С (mg/L)		0,025	0,554	0,535	0,573
		0,975	0,983	0,947	1,019
Албумин в урината (mg/L)	Мъже	0,025	5,005	3,610	6,413
		0,975	17,765	16,939	18,323
	Жени	0,025	5,136	3,940	6,378
		0,975	20,360	19,624	21,019
АСР (mg/mmol)	Мъже	0,025	0,330	-	-
		0,975	7,834	-	-
	Жени	0,025	0,614	0,513	0,732
		0,975	7,506	6,009	11,132

ДИ – доверителен интервал.

Установяваме значима полова разлика за албумина в урината с по-високи стойности при жените. ГФ е статистически по-висока при мъжете само при формулата с цистатин С (табл. 9).

Албуминът в урината корелира значимо, правопрпорционално с АСР ($r=0,224$, $p < 0,05$) и обратнопропорционално с креатинина в серума ($r=-0,178$, $p < 0,05$) (табл. 10).

Таблица 9: Сравнителен анализ на албумина и ГФ при двата пола

Показател	Мъже (n=63)		Жени (n=90)		p
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Албумин (mg/L)	12,11	3,53	13,48	4,31	0,035
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	77,24	13,63	75,52	14,54	0,351
eGFR (СКD-EPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	83,56	13,31	85,73	16,57	0,551
eGFR (СКD-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	112,31	15,51	108,05	14,54	0,039
eGFR (СКD-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	98,69	12,48	96,67	13,71	0,356

Таблица 10: Корелационни коефициенти между албумина и показателите креатинин в серум, цистатин С, АСR, РСR, възраст и ВМІ

Показател	Албумин
Креатинин в серум (μmol/L)	-0,178*
Цистатин С (mg/L)	0,012
АСR (mg/mmol)	0,224*
РСR (mg/mmol)	-0,099
Възраст (години)	0,112
ВМІ (kg/m ²)	0,070

* - p<0,05

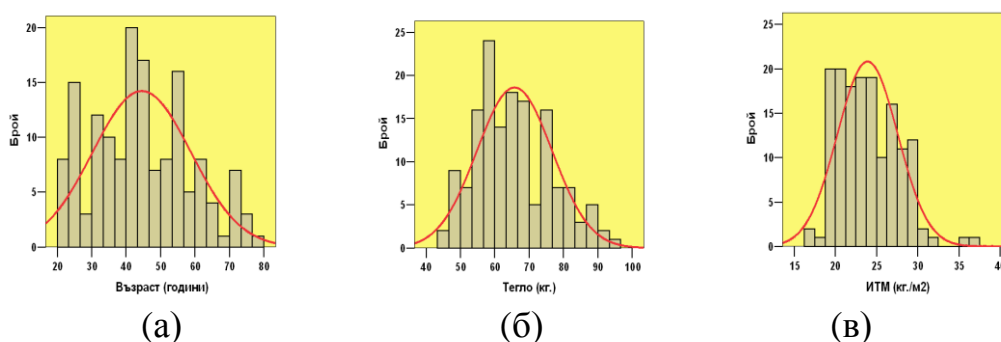
Таблица 11: Корелационни коефициенти между ГФ и показателите албумин, общ белтък, АСR, РСR, възраст и ВМІ

Показател	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (СКD - EPI) само с креатинин	eGFR (СКD - EPI) само с цистатин С	eGFR (СКD - EPI) с креатинин и цистатин С
Креатинин в серум (μmol/L)	-0,679***	-0,686***	0,139	-0,360***
Цистатин С (mg/L)	-0,108	-0,148	-0,857***	-0,653***
Албумин (mg/L)	0,065	0,077	-0,122	-0,002
Общ белтък (mg/L)	0,035	0,047	0,089	0,115
АСR (mg/mmol)	0,101	0,082	-0,111	0,013
РСR (mg/mmol)	0,094	0,081	0,043	0,109
Възраст (години)	-0,135	-0,323***	-0,622***	-0,538***
ВМІ (kg/m ²)	-0,039	-0,113	-0,051	-0,090

*** - $p < 0,001$

Представените в табл. 11 резултати показват корелационните зависимости между ГФ, определена с различните формули и основните показатели. Особено ясно изразена е тази корелация с цистатин С, креатинина и възрастта. Всички контроли са с албуминурия А1 с изключение на двама и ГФ между 75 и 112 mL/min/1.73 m², в зависимост от използваното уравнение.

Показателите възраст, ВМІ (ИТМ) и тегло (фиг. 4) имат Гаусово разпределение (Колмогоров-Смирнов, $p = 0,499$; $p = 0,291$ и $p = 0,394$).



Фигура 4: Честотно разпределение на контролите по възраст (а), тегло (б) и ВМІ (в). При всички показатели е Гаусово (тест на Колмогоров-Смирнов, $p \geq 0,05$)

Броят на контролите и получените стойности за отделните показатели при тях ни дават основание да приемем, че те могат да бъдат приети като референтни стойности у нас, спрямо които да се сравняват показателите на болните.

3.6.2 Диабетици

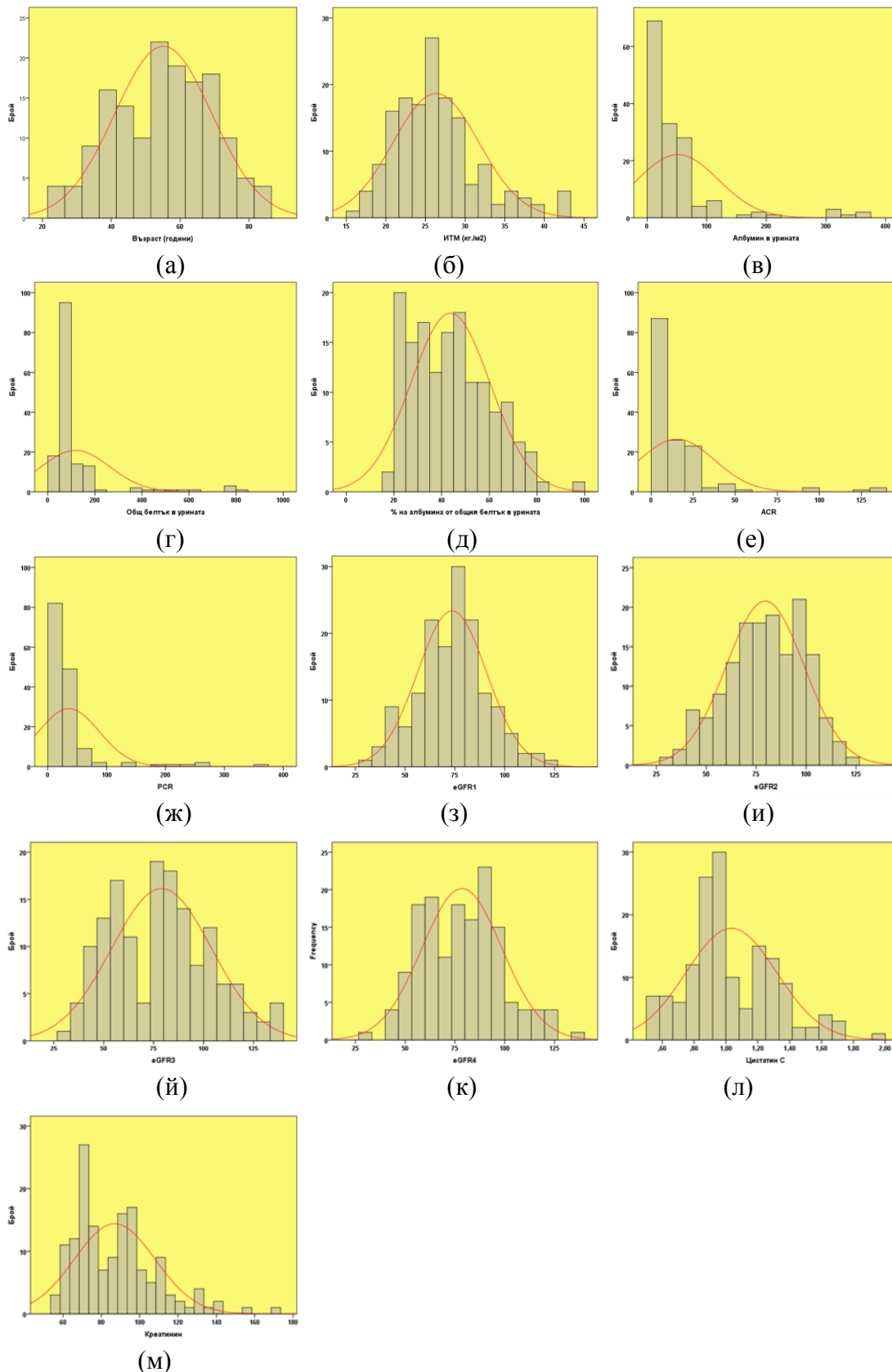
В групата на диабетиците са включени общо 152 болни с диабет тип 2, от които 80 (52,6%) – мъже и 72 (47,4%) – жени. Средната възраст е 55,12 г. в интервал от 24 до 82 г. и е по-висока от тази на контролите (табл. 12). При подбора на всички тези диабетици не е регистрирано повишено кръвно налягане въпреки продължителността на диабета и въпреки многократната проверка на кръвното налягане.

Таблица 12: Вариационен анализ на изследваните показатели при диабетиците

ПОКАЗАТЕЛ	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Възраст (години)	152	55,12	14,13	56,00	24,00	82,00
РЪСТ (см.)	152	167,34	7,73	165,50	146,00	188,00
ТЕГЛО (кг.)	152	74,18	18,35	71,50	47,00	140,00
ВМІ (кг/м ²)	152	26,33	5,42	25,96	15,89	43,21

Средните стойности на антропометричните характеристики са по-високи при диабетиците в сравнение с контролната група в това число теглото (74 кг. спрямо 65 кг.) и BMI (26 спрямо 23,91). Болните са с давност на диабета от 2 г. (8 болни, 5,3%) до 12 г. (3 болни, 2%) с интервал от 1 година, като най-много са болните с давност на диабета 6 г. (18 болни, 11,8%). Това е сравнително кратка давност на диабета. Честотното разпределение при диабетиците на по-важните показатели е представено на фигура 5. Разпределението по възраст и BMI е тип Гаусово, а за албумин и общ белтък в урината, за ACR и PCR не-Гаусово.

Не-Гаусово разпределение показват повечето от показателите. Това е свързано с различната степен на изразеност на показателя от референтната до патологичната област. От графиките е видно, че при диабетиците разпределението на албумин и ОБ в урината, ACR и PCR е изтеглено вляво, към референтните интервали с преобладаване на албуминурия A1 и A2 и нормална до умерена протеинурия. Честотното разпределение по ГФ е Гаусов тип с уравнения само с креатинин и не е нормално с комбинираната формула и тази само с цистатин С. С последните две уравнения кривата е разширена доста повече. Разпределението на креатинина в серума е по-широко и леко изтеглено към референтната област в сравнение с цистатин С. Това е резултат на съчетаването на болни с нормален креатинин и увеличен цистатин С.



Фигура 5: Честотно разпределение на диабетците по възраст, $p=0,681$ (а); по BMI, $p=0,091$ (б); по албумин в урината, $p<0,001$ (в); по общ белтък в урината, $p<0,001$ (г); по процент на албумина от общия белтък, $p=0,36$ (д); по ACR $p<0,001$ (е); по PCR, $p<0,001$ (ж); по ГФ с MDRD, $p=0,200$ (з); по ГФ СКД-EPI с креатинин, $p=0,200$ (и); по ГФ СКД-EPI само с цистатин С, $p<0,001$

(й); ГФ СКД-ЕPI с креатинин и цистатин С, $p=0,200$ (к); по серумен цистатин С, $p<0,001$ (л); по серумен креатинин, $p<0,001$ (м).

Данните от вариационния анализ на изследваните показатели са представени в табл. 13. Статистически значими промени показват всички изследвани показатели ($p<0,05$). Средната стойност на екскрецията на албумина е увеличена над четири пъти спрямо контролите (51,43 спрямо 12,92 mg/l), а ОБ над два пъти (118 спрямо 54,39 mg/l). Всички показатели от липидния профил са променени, както и пикочната киселина е увеличена (316,74 спрямо 256,92 $\mu\text{mol/l}$). Въпреки контролираната терапия глюкозата и HbA1c са също увеличени.

Таблица 13: Вариационен анализ на изследваните показатели при диабетците

Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Цистатин С (mg/L)	152	1,03	0,28	0,98	0,51	1,98
Креатинин в урината ($\mu\text{mol/L}$)	150	4,53	2,88	3,65	1,09	14,93
Албумин в урината (mg/L)	150	51,43	67,46	28,50	10,00	364,00
Общ белтък в урина (mg/L)	152	118,01	145,68	72,00	19,00	825,00
Процент на албумина от общия белтък в урината (%)	150	43,70	16,68	41,75	16,50	97,20
ACR (mg/mmol)	148	15,25	22,31	7,60	1,00	137,66
PCR (mg/mmol)	150	35,87	51,44	21,81	2,18	373,21
Холестерол (mmol/L)	152	5,98	1,11	5,91	3,90	9,97
Триглицериди (mmol/L)	152	2,04	0,85	1,97	0,59	4,81
HDL- С (mmol/L)	152	1,07	0,24	1,00	0,62	1,98
LDL – С (mmol/L)	152	3,72	1,00	3,61	1,90	7,11
Глюкоза (mmol/L)	152	7,28	2,28	6,96	3,70	14,20
Гликиран хемоглобин (%)	152	7,17	1,41	6,98	4,97	12,30
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	152	86,97	21,07	86,00	56,00	169,00
Пикочна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	152	316,74	84,82	307,50	139,00	504,00
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	152	73,55	17,31	74,17	28,88	120,91
eGFR (СКД-ЕPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	152	79,51	19,46	80,42	29,47	120,72
eGFR (СКД-ЕPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	152	78,97	25,06	79,66	31,81	137,88
eGFR (СКД-ЕPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	152	78,52	20,07	78,34	31,00	135,66

Средната стойност на ГФ, определена и с четирите формули, е намалена спрямо контролите с най-голям процент при уравнението само с цистатин С (38%), следвана от комбинираната формула с креатинин и цистатин С (24%). Най-малка е разликата при формулата само с креатинин с MDRD (3,7%) (табл. 13). Много повече са диабетиците с албинурия А2 и А3 (48,6%) в сравнение с тези с ГФ <math>< 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2</math> (29,6%).

Таблица 14: Сравнителен анализ на албумин и общия белтък в урината при двата пола

Показател	Мъже (n=80)		Жени (n=72)		p
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Албумин в урината (mg/L)	56,06	68,38	46,42	66,56	0,119
Общ белтък в урината (mg/L)	127,23	147,70	107,78	143,73	0,133

От таблица 14 се вижда, че и при диабетиците се регистрира незначителна полова разлика при някои показатели. Обратно на контролите албинурията и протеинурията са по-силно изразени при мъжете в сравнение с жените (56,06 към 46,42 mg/l и 127,23 към 107,78 mg/l съответно).

В таблица 15 се сравняват основните показатели между контроли и диабетици. Контроли и диабетици се разграничават значимо по почти всички показатели, когато се сравняват средните аритметични стойности.

Протеинурията е правопрпорционално и статистически значимо свързана с показателите давност на заболяването, ACR, креатинин в серум и Цистатин С (таблица 16).

С протеинурия до 150 mg/l са 126 болни - 84%, до 500 mg/l са 20 болни - 13,3% и само 4 болни имат ОБ над 500 mg/l - 2,7%.

Степента на албинурията корелира слабо и правопрпорционално с възрастта на болните, давността на заболяването, общия белтък в урината, PCR, цистатин С и креатинин в серума и изразено с концентрацията на HbA1c (таблица 17). При общия белтък корелацията е по-силна в сравнение с албумина и ACR.

Таблица 15: Сравнителен анализ на контроли и диабетици по избрани показатели

Показатели	Контроли			Диабетици			p
	Брой	\bar{X}	SD	Брой	\bar{X}	SD	
Албумин в урината (mg/L)	153	12,92	4,05	152	51,43	67,46	<0,001
Протеин в урината (mg/L)	153	54,39	19,24	152	118,01	145,68	<0,001
Креатинин в кръвен серум ($\mu\text{mol/L}$)	153	83,47	15,44	152	86,97	21,07	0,534
Цистатин С (mg/L)	153	0,74	0,11	152	1,03	0,28	<0,001
Общ холестерол (mmol/L)	153	4,72	0,60	152	5,98	1,11	<0,001
LDL-холестерол (mmol/L)	153	2,62	0,44	152	3,72	1,00	<0,001
HDL-холестерол (mmol/L)	153	1,15	0,16	152	1,07	0,24	<0,001
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	153	76,24	14,15	152	73,55	17,31	0,426
eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	153	84,83	15,31	152	79,51	19,46	0,070
eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	153	109,81	15,05	152	78,97	25,06	<0,001
eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	153	97,52	13,20	152	78,52	20,07	<0,001

Таблица 16: Корелационни коефициенти между общия белтък и основните показатели.

Показател	Общ белтък в урината
Възраст (години)	0,107
Давност на заболяването (години)	0,635***
ACR (mg/mmol)	0,715***
Цистатин С (mg/L)	0,457***
Креатинин в серум ($\mu\text{mol/L}$)	0,200*

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

Таблица 17: Корелационни коефициенти между албумина в урината и основните показатели

Показател	Албумин в урината
Възраст (години)	0,204*
Давност на заболяването (години)	0,219**
Общ белтък в урината (mg/L)	0,258**
ACR (mg/mmol)	0,258**
PCR (mg/mmol)	0,170*
Цистатин С (mg/L)	0,243**
Креатинин в серум ($\mu\text{mol/L}$)	0,182*
Гликиран хемоглобин (%)	0,581***
Глюкоза (mmol/L)	0,204*

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

От таблици 16 и 17 се вижда, че албуминът в урината корелира най-добре с HbA1c ($r=0,581$), ACR ($r=0,258$) и общия белтък ($r=0,258$) в урината. Корелацията на албумина е по-силна с цистатин С ($r=0,243$) в сравнение с креатинина ($r=0,182$). При общия белтък в урината корелацията е силна с ACR ($r=0,715$) и давността на заболяването ($r=0,635$). И тук корелацията е по-силна с цистатин С ($r=0,457$), отколкото с креатинина ($r=0,200$).

На таблица 18 са представени показателите чувствителност и специфичност, както и предиктивната стойност на изследваните параметри. Избраната прагова величина цели постигането на висока чувствителност и точност. Най-висока чувствителност показва ACR (94%), а най-голяма специфичност - албуминът и ГФ (с известна разлика за отделните формули). Положителната предиктивна стойност е най-висока за eGFR (СКД-ЕП) само с цистатин С - 76%, а отрицателната

предиктивна стойност за ACR е 91%. С най-висока точност са eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С със 78% и ACR със 77%.

От проследените 152 диабетици с албуминурия А1 са 77 болни - 51,3%, с албуминурия А2 - 67 болни - 44,6% и с албуминурия А3 - само 6 болни - 4% (табл. 19).

На таблица 19 е показана още зависимостта на албуминурията от възрастта на болните, от давността на заболяването и процента на HbA1c. Колкото по млади са болните и с колкото по-кратка давност е диабетът им, толкова по-често са с албуминурия А1.

Таблица 18: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на диабетиците от здравите индивиди

Показател	Прагова величина	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	Положителна предиктивна стойност (%)	Отрицателна предиктивна стойност (%)	Точност (%)
Албумин в урината (mg/L)	≥ 15,5	80	70	72	78	75
Общ белтък в урината (mg/L)	≥ 54,5	84	50	63	76	67
ACR (mg/mmol)	≥ 2,36	94	60	70	91	77
PCR (mg/mmol)	≥ 10,25	84	62	69	80	73
LDL холестерол (mmol/L)	≥ 2,89	82	63	69	77	72
Общ холестерол (mmol/L)	≥ 5,09	86	67	72	82	76
Триглицериди (mmol/L)	≥ 1,37	75	56	63	69	65
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	-	-	-	-	-	-
eGFR (СКD-EPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	-	-	-	-	-	-
eGFR (СКD-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	≤ 102,48	82	75	76	80	78
eGFR (СКD-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	≤ 93,61	80	61	67	76	71
Цистатин С (mg/L)	≥ 0,80	81	69	72	79	75
Креатинин в серум (μmol/L)	-	-	-	-	-	-

Таблица 19: Сравнителен анализ на възрастта, давността на заболяването и концентрацията на HbA1c според нивата на албумина в урината

Показатели	Албумин в урината								
	До 29 мг/л (A1)			30-300 мг/л (A2)			Над 300 мг/л (A3)		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD
Възраст (години)	77	52,70 ^a	13,79	67	57,00 ^b	14,47	6	61,83	11,62
Давност на заболяването (години)	77	6,04 ^a	2,70	67	8,90 ^b	3,04	6	10,00	1,67
Концентрация на HbA1c (%)	77	6,63 ^a	1,10	67	7,71 ^b	1,47	6	7,46	1,74

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

** - групата с албумин в урината над 300 мг/л не участва в анализа поради недостатъчната си статистическа представителност

Таблица 20: Корелационни коефициенти между гломерулната филтрация и някои показатели

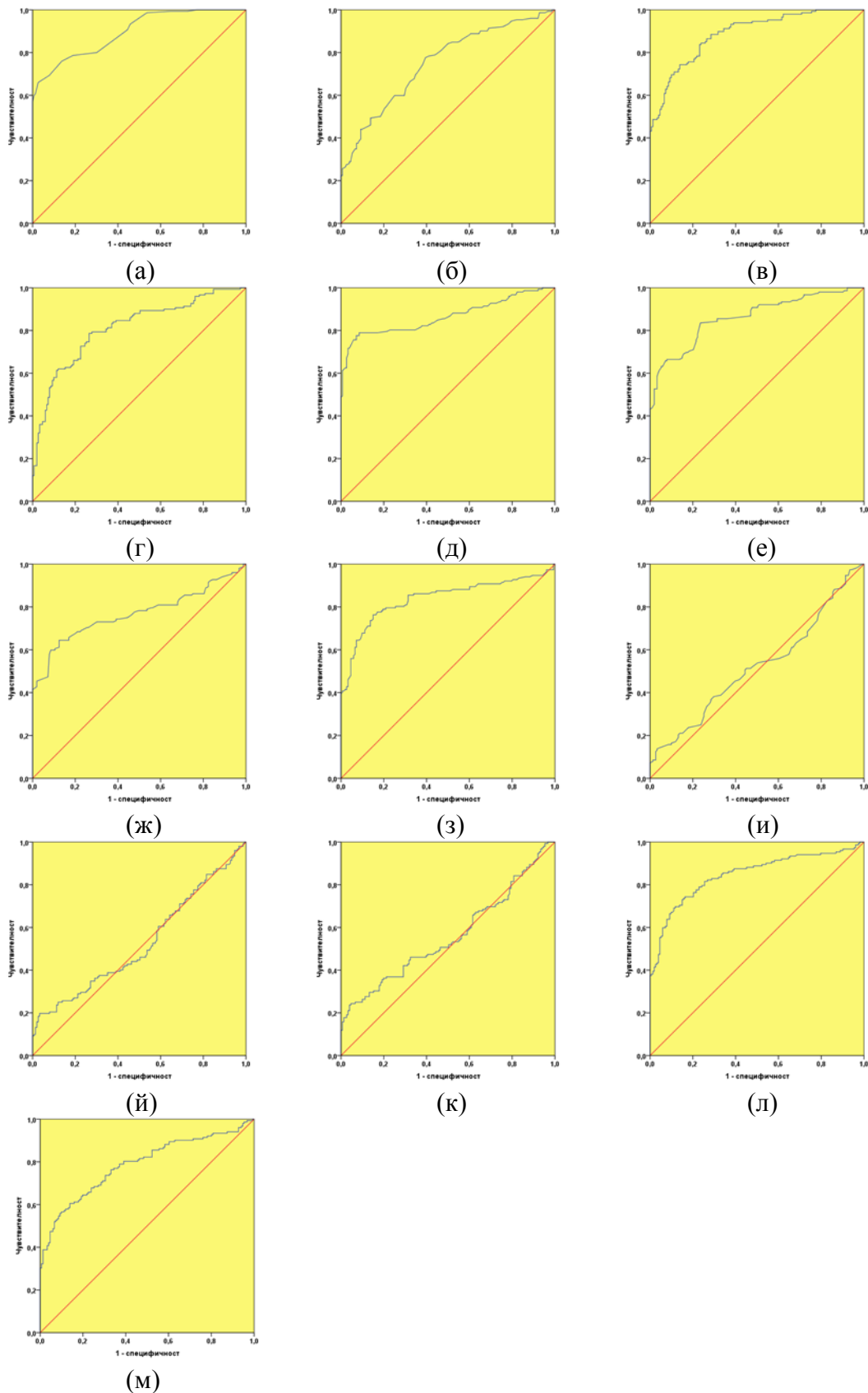
Показатели	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (СКД-EPI) само с креатинин	eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С	eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С
Албумин в урината (mg/L)	-0,079	-0,120*	-0,562***	-0,471***
Общ белтък в урината (mg/L)	-0,070	-0,092	-0,395***	-0,337***
ACR (mg/mmol)	-0,070	-0,119*	-0,530***	-0,443***
PCR (mg/mmol)	-0,072	-0,110	-0,430***	-0,362***
Възраст (години)	-0,311***	-0,486***	-0,601***	-0,613***
ВМІ	-0,077	-0,147*	-0,130*	-0,136*
Давност на заболяването (години)	-0,458***	-0,481***	-0,719***	-0,716***
НbA1c (%)	-0,072	-0,118*	-0,527***	-0,449***
Глюкоза (mmol/L)	-0,101	-0,151**	-0,505***	-0,441***
Общ холестерол (mmol/L)	-0,055	-0,092	-0,431***	-0,370***
LDL-C(mmol/L)	-0,091	-0,125*	-0,428***	-0,382***
Триглицериди(mmol/L)	-0,033	-0,074	-0,379***	-0,305***
Цистатин С(mg/L)	-0,207***	-0,272***	-0,956***	-0,833***
Креатинин в кръвен серум (μmol/L)	-0,754***	-0,755***	-0,092	-0,396***

*** - $p < 0,001$ ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Средните нива на ГФ, определени с 4-те формули, са по-ниски от тези в контролната група (таблица 15). С ГФ, изчислена с комбинираната формула, $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ са 48 болни - 31,6%; с ГФ от 89 до 60 mL/min/1.73 m^2 са 72 болни - 47,4%; с от 59 до 45 са 28 болни - 18,4% и с от 30 до 44 са 4 болни - 2,6%. С ГФ под 60 mL/min/1.73 m^2 са 32 болни - 21,1%. Корелационните коефициенти на ГФ, изчислена с четирите формули, е обратнопропорционална на всички изследвани показатели. Коефициентите са най-високи на ГФ с давност на заболяването ($r = -0,716$), с възрастта ($r = -0,613$), с албумина в урината ($r = -0,471$) и с НbA1c ($r = -0,449$). Прави впечатление, че ГФ, изчислена само с цистатин С, дава по-високи корелационни коефициенти в сравнение с останалите формули. Най-ниска е корелацията с уравнението MDRD.

Липидният профил е променен при голяма част от болните – общ холестерол при cut off $> 6 \text{ mmol/l}$ при 62 болни - 40,8%; LDL-C при cut off $> 3,65 \text{ mmol/l}$ при 71 болни - 46,7% и HDL-C при cut off $< 1,0 \text{ mmol/l}$ при 61 болни - 40,6%. Въпреки провежданата терапия глюкозата и гликираният хемоглобин по време на изследването са също значително повишени спрямо контролите (средна стойност - 7,28 - към 4,93 и 7,17 - към 5,37 съответно). При приет cut off за НbA1c $> 6,5\%$ и за глюкоза $> 6,3 \text{ mmol/l}$ с увеличени стойности са 59,7% и 60% съответно от диабетичите

За определяне праговите стойности на количествените променливи е приложен анализ на ROC криви (фигура 6) с критерии чувствителност и специфичност в проценти. При този анализ се установява, че най-добър показател за отграничаване на диабетиците от контролите е ACR с чувствителност 94% и точност 77%, следван от ГФ, оценена с комбинация от цистатин С и креатинин при чувствителност 82% и точност 78%.



Фигура 6: ROC-криви за определяне на прагови стойности при отграничаването на диабетците от контролната група: а/ албумин в урината (площ под кривата 0,895, $p < 0,001$); б/ ОБ в урината (площ под кривата 0,751, $p < 0,001$); в/ ACR (площ под кривата 0,888, $p < 0,001$); г/ PCR (площ под кривата 0,811, $p < 0,001$); д/%албумин от общия белтък(площ под кривата 0,791, $p < 0,001$ е/ LDL-C (площ под кривата 0,866, $p < 0,001$); ж/ TG (площ под кривата 0,767, $p < 0,001$); з/ серумен

цистатин С (площ под кривата 0,839, $p < 0,001$); и/ серумен креатинин (площ под кривата 0,521, $p = 0,535$); ѝ/ eGFR с MDRD (площ под кривата 0,526, $p = 0,426$); к/ eGFR с СКD-EPI с креатинин (площ под кривата 0,560, $p = 0,070$); л/ eGFR с СКD-EPI с цистатин С (площ под кривата 0,846, $p < 0,001$); м/ eGFR с комбинираната формула (площ под кривата 0,787, $p < 0,001$).

Чрез анализа на ROC-кривите и оценката на площта под кривите много ясно се демонстрира диагностичната точност на отделните показатели, особено на албумина в урината и ACR. При сравнение на ROC-кривите на цистатин С и креатинин, се вижда предимството на първия (площ под кривата 0,839 спрямо 0,521). По отношение на ГФ, ROC кривите разкриват предимството на комбинираната формула или на формулата само с цистатин С спрямо формулите с креатинин (сравнете площта под кривата на фигура 6). При сравнение на албуминурията с ГФ прави впечатление, че по-голям е процентът на диабетиците с увеличена екскреция на албумин, албуминурия А2 - 44,77% и с А3 - 4%, или общо 48,67% спрямо 21,1% болни с ГФ<60 mL/min/1.73 m².

3.6.3 Хипертоници

В групата на хипертониците са включени общо 150 болни с първична (есенциална) хипертония, от които 65 (43,3%) мъже и 85 (56,7%) жени. Жените са малко повече от мъжете. Средната възраст е 49,85 г. в интервал от 21 г. до 74 г. и е в обхват, близък до този на контролите (таблица 21).

Средните стойности на антропометричните характеристики са малко по-високи при хипертониците в сравнение с контролната група.

Таблица 21: Вариационен анализ на възрастта и антропометричните показатели при хипертониците

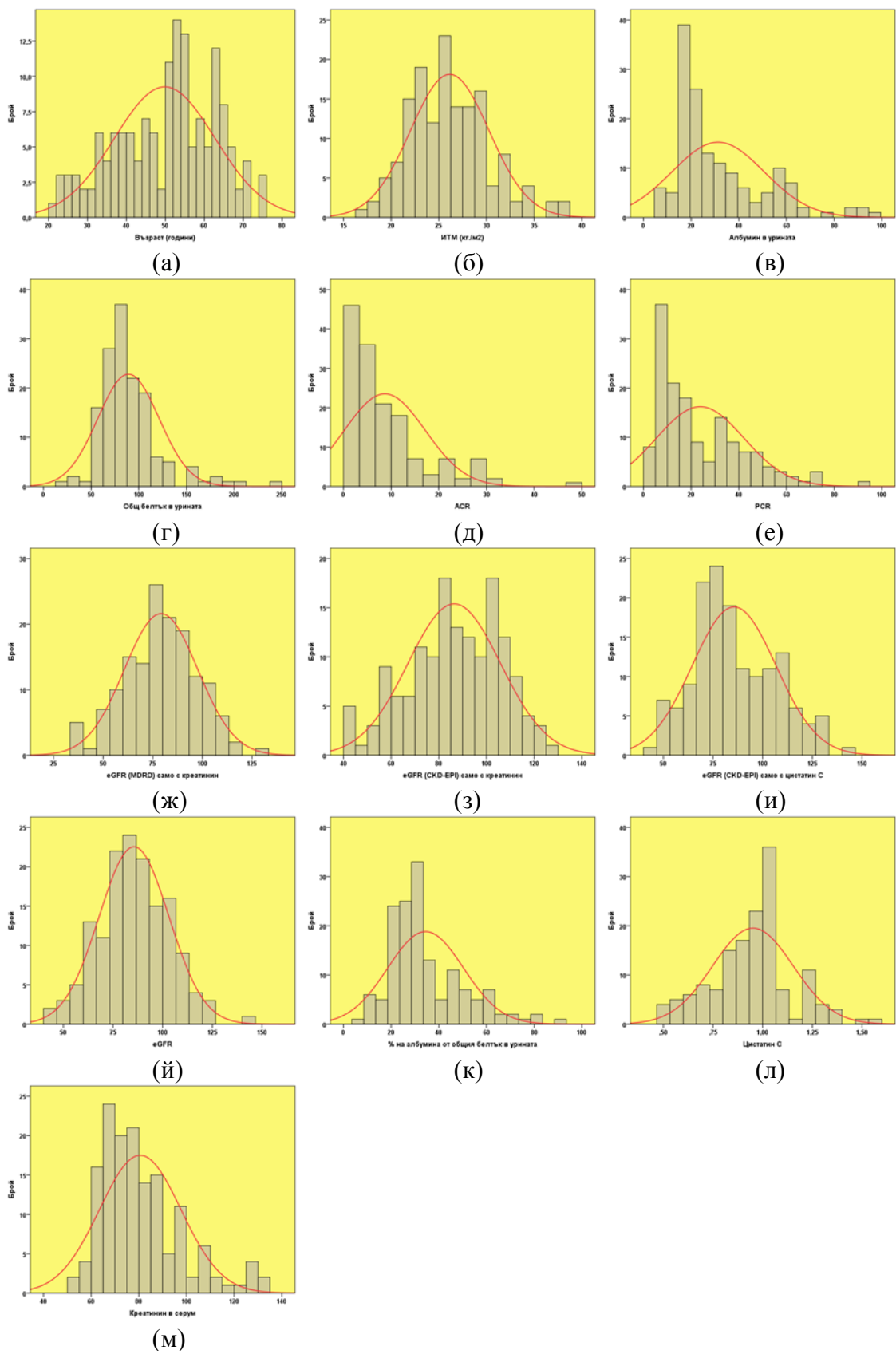
Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Възраст (години)	150	49,85	12,92	52,00	21,00	74,00
Ръст (см.)	150	167,83	8,66	166,00	150,00	191,00
Тегло (кг.)	150	73,95	15,03	72,00	52,00	120,00
ИТМ (кг/м ²)	150	26,14	4,13	25,66	16,60	38,39

Хипертониците са с по-високи показатели за възраст (49,85 спрямо 44,53), тегло (73,95 спрямо 65,74 кг) и ВМІ (26,14 спрямо 23,91). Болните са с давност на хипертонията от 1 г. (2 болни) до 22 г. (1 болен) с интервал от 1 година, като най-много са болните с давност на хипертонията 3 г. (24 болни, 16%). С диастолично налягане > 81 mmHg по време на изследването са 87 болни (58%); със систолично налягане >140 mmHg са 50 болни (33%). Честотното разпределение при хипертониците на някои от показателите е представено на фигура 7.

От представените данни на фигура 7 се вижда, че Гаусово разпределение показват ВМІ и ГФ. Всички останали показатели имат не Гаусово разпределение. По отношение на възрастта разпределението е

изместено в дясно към по-голямата възраст, а за всички останали показатели кривата е разширена и максимумът на разпределението е изместен в ляво по-близо до референтната област. Стойностите за цистатин С са разположени предимно в средата, докато за креатинина те са леко изместени в ляво, към горната референтна граница.

Данните от вариационният, сравнителният и корелационният анализ на изследваните показатели са представени последователно на таблици 22-24.



Фигура 7: Честотно разпределение при хипертоници по: а/ възраст, $p=0,001$; б/ BMI $p=0,200$; в/ албумин в урината, $p<0,001$; г/ общ белтък в урината, $p<0,001$; д/ ACR, $p<0,001$; е/ PCR, $p<0,001$; ж/ eGFR (MDRD) само с креатинин, $p=0,200$; з/ eGFR (CKD-EPI) само с креатинин, $p=0,078$; и/ eGFR

(СКД-EPI) само с цистатин С, $p=0,001$; й/ eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С, $p=0,200$; к/ процент на албумина от общия белтък в урината, $p<0,001$; л/ цистатин С, $p<0,001$; м/ креатинин в серум, $p<0,001$.

Таблица 22: Вариационен анализ на изследваните показатели при хипертониците

Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Цистатин С (mg/L)	149	0,95	0,20	0,98	0,51	1,56
Креатинин в урината (mmol/L)	148	6,31	4,60	4,62	1,20	19,40
Албумин в урината (mg/L)	148	31,26	19,37	22,50	7,00	97,00
Общ белтък в урина (mg/L)	147	89,10	32,13	79,00	20,00	241,00
Процент на албумина от общия белтък в урината (%)	150	34,44	15,89	30,50	6,00	90,00
ACR (mg/mmol)	150	8,66	8,48	4,84	0,58	49,24
PCR (mg/mmol)	149	23,77	18,34	17,57	1,23	90,86
Холестерол (mmol/L)	150	5,96	1,30	5,97	3,78	11,20
Триглицериди (mmol/L)	150	1,87	0,74	1,82	0,60	4,10
HDL-C (mmol/L)	150	1,06	0,19	1,02	0,58	1,54
LDL-C (mmol/L)	150	3,82	1,19	3,73	1,62	8,29
Глюкоза (mmol/L)	150	5,00	0,80	4,97	3,16	7,51
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	150	80,56	17,09	77,00	50,80	133,00
Пикочна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	150	311,06	61,58	305,10	161,90	450,00
eGFR (MDRD) само с креатинин(ml/min/1.73mm^2)	150	79,19	18,46	79,32	37,07	129,86
eGFR (СКД-EPI) само с креатинин(ml/min/1.73mm^2)	150	86,45	19,44	87,60	40,22	125,76
eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С(ml/min/1.73mm^2)	149	85,60	21,02	81,24	43,11	145,45
eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm^2)	149	85,56	17,58	85,24	43,65	140,09

Всички средни стойности на изследваните показатели при хипертониците са по-високи от съответните в контролната група. Статистически значимо увеличение ($p<0,05$) спрямо контролите има при албумин в урината (31,26 към 12,92 mg/l), общ белтък в урината (89,1 към 54,39 mg/l), процент на албумина от ОБ (34,44 към 26,14), ACR (8,66 към 2,47), PCR (23,77 към 10,5), общ холестерол (5,96 към 4,72 mmol/l), LDL-C (3,82 към 2,62 mmol/l) пикочна киселина (311,06 към 256,92 $\mu\text{mol/l}$). Стойностите за ГФ установени с отделните уравнения са много близки, а

тези само с цистатин С и с комбинираната формула са идентични (85,6 спрямо 85,56 mL/min/1,73 m²). Спрямо контролите намалението на ГФ е слабо, статистически незначимо.

Таблица 23: Сравнителен анализ на албумин и общ белтък в урината при двата пола

Показател	Мъже (n=65)		Жени (n=85)		p
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Албумин в урината (mg/L)	31,79	19,14	30,87	19,65	0,499
Общ белтък в урината (mg/L)	91,71	32,43	87,13	31,95	0,126

При хипертониците за разлика от контролите, албуминът и общият белтък в урината са статистически незначимо по-високи при мъжете в сравнение с жените (табл. 23).

Таблица 24: Корелационни коефициенти между албумина в урината и някои показатели

Показатели	Албумин в урината
Възраст (години)	0,119
Давност на заболяването (години)	0,488***
ВМІ (kg/m ²)	0,150
Общ белтък в урината (mg/L)	0,675***
ACR (mg/mmol)	0,640***
PCR (mg/mmol)	0,345***
Цистатин С (mg/L)	0,387***
Креатинин в серум (μmol/L)	0,366***
Общ холестерол (mmol/L)	0,205*
LDL-C (mmol/L)	0,174*

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Концентрацията на албумина в урината изразено, правопрпорционално корелира с общия белтък (r=0,675), ACR (r=0,640) и давност на заболяването (r=0,488). При сравнение на цистатин С с креатинина, корелацията е по-силна с цистатин С (r=0,388 спрямо r=0,366) (табл. 24).

Таблица 25: Корелационни коефициенти между общия белтък в урината и някои показатели

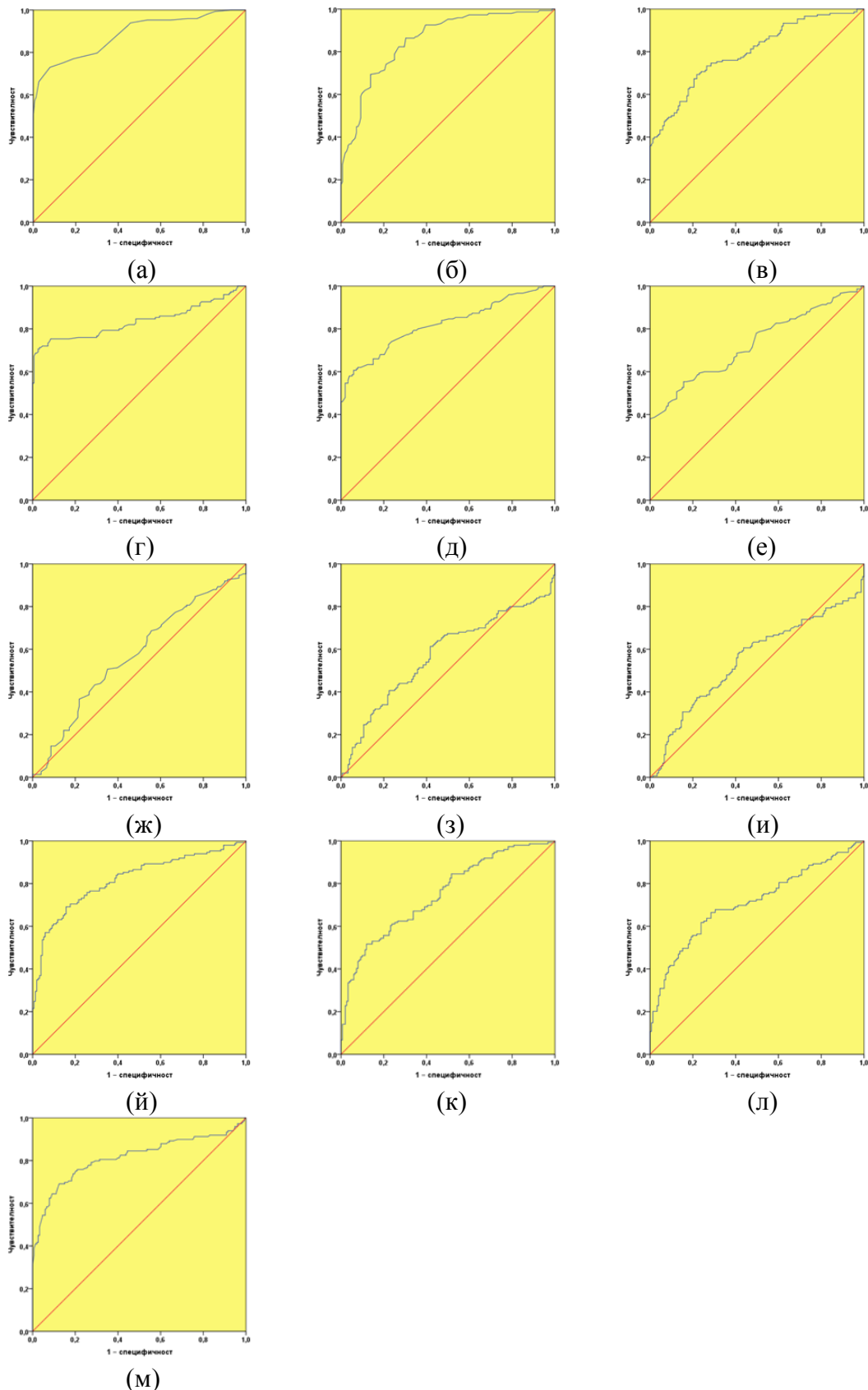
Показател	Общ белтък в урината
Възраст (години)	0,086
Давност на заболяването (години)	0,530***
ACR (mg/mmol)	0,444***
Цистатин С (mg/L)	0,427***
Креатинин в серум ($\mu\text{mol/L}$)	0,377***

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

Общият белтък в урината най-добре корелира с давността на хипертонията ($r=0,530$) и ACR ($r=0,444$). Отново корелацията с цистатин С е по-голяма от тази с креатинина ($r=0,427$ към $r=0,377$) (табл. 25).

ROC кривите (фигура 8) ясно демонстрират диагностичната значимост на изследваните показатели. От тях се вижда, че белтъчните показатели (албумин, ACR, ОБ и PCR) са с по-голяма точност от ГФ. От друга страна, от използваните четири формули за изчисление на ГФ, тези с участието на цистатин С са със значимо по-голяма площ под кривата от тези с участието на креатинина (0,817 към 0,572). Същото се потвърждава и от чувствителността, специфичността и чувствителност, които са с високи проценти с цистатин С (таблица 27) спрямо креатинина. Статистически значими прагови стойности се установяват за албумин и общ белтък в урината, ACR, PCR, LDL-C, TC, TG. Според ГФ, изчислена с комбинираната формула, хипертониците се разпределят, както следва: ГФ $>90 \text{ mL/min/1,73m}^2$ са 55 болни, 36,9%, от 60 до 89 са 84 болни, 56,4%, от 45 до 59 са 8 болни, 5,4%, от 30 до 44 са 5 болни, 1,3%. С ГФ $< 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ са 13 болни, 8,6%. Най-голям процент от болните са в групата с ГФ от 60 до 89 mL/min/1,73m^2 , 84 болни, 56,4%. При избора на прагова величина критерии за оптимизация са висока чувствителност, специфичност и точност.

Според получените стойности на критериите за валидизация, като най-добър показател за отграничаване на хипертониците от контролите е албумина в урина с чувствителност 93% и точност 74%, следван от общия белтък чувствителност 86% и точност 78% и ACR с 81% и 67%. Най-ненадежден е показателят ГФ с формулата MDRD с чувствителност 80% и точност 50% (таблица 27).



Фигура 8: ROC крива за албумин (площ под кривата 0,884, $p < 0,001$) (а); общ белтък (площ под кривата 0,854, $p < 0,001$) (б); ACR (площ под кривата 0,797, $p < 0,001$) (в); LDL-C (площ под кривата 0,836, $p < 0,001$) (г); TC (площ под кривата 0,821, $p < 0,001$) (д); TG (площ под кривата 0,729, $p < 0,001$) (е); серумен креатинин (площ под кривата 0,571, $p = 0,032$) (ж); ГФ с креатинин (MDRD) (площ под кривата 0,571, $p = 0,032$) (з); ГФ с креатинин (СКР-EPI) площ под кривата 0,552, $p = 0,119$) (и); ГФ с цистатин С (площ под кривата 0,818, $p < 0,001$) (й); ГФ с комбинираната формула (площ под кривата 0,710, $p < 0,001$) (к); PCR (площ под кривата 0,750, $p < 0,001$) (л); серумен цистатин С (площ под кривата 0,815, $p < 0,001$) (м).

Таблица 26: Сравнителен анализ на възрастта и давността на заболяването според нивата на албумина в урината

Показатели	Албумин в урината						p
	До 29 мг/л			30-300 мг/л			
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Възраст (години)	89	48,07	13,49	59	52,46	11,86	0,058
Давност на заболяването (години)	89	5,75	4,15	59	9,56	5,32	<0,001

При категоризиране на албуминурията, като А1, А2 и А3 се установява, че с нормален или леко увеличен албумин в урината А1 (<30 mg/l) са 89 от хипертониците (60,1%) и с албуминурия А2 (микроалбуминурия) с 30 – 300 mg/l са 59 от болните (39,9%) и без нито един болен с албуминурия А3 (макроалбуминурия >300 mg/l). Нормална, албуминурия А1 е по-честа при по-младите болни и с по-ниски стойности на систоличното и диастоличното налягане (табл. 26). При хипертониците с ГФ <60 mL/min/1.73 m² са 13 болни, 8,6%, докато с албуминурия А2 са 59 болни, 39,9%, следователно установяваме по-често патологична албуминурия, отколкото намалена ГФ.

Таблица 27: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на хипертониците от здравите индивиди

Показател	Прагова величина	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	Положителна предиктивна стойност (%)	Отрицателна предиктивна стойност (%)	Точност (%)
Албумин в урината (mg/L)	≥ 14,5	93	56	67	89	74
Общ белтък в урината (mg/L)	≥ 64,5	86	70	73	84	78
ACR (mg/mmol)	≥ 2,05	81	53	63	74	67
PCR (mg/mmol)	≥ 8,07	81	50	61	72	65
Общ холестерол (mmol/L)	≥ 5,00	80	64	69	77	72
LDL холестерол (mmol/L)	≥ 2,85	80	59	66	75	69
Триглицериди (mmol/L)	≥ 1,37	83	39	57	70	61
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	≥ 64,5	80	21	50	52	50
eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	≤ 107,34	83	61	68	78	72
eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С	≤ 101,11	81	40	57	67	60
Цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	≥ 0,78	81	63	68	77	72
Креатинин в серум (μmol/L)	≤ 92,00	80	28	53	59	54

На таблица 28 се наблюдава значима, силна до умерена обратнопропорционална корелация между ГФ и увеличението на лабораторните показатели с изключение на ВМІ. В най-висока степен е обратната корелация на ГФ с АСR, РСR и давност на хипертонията и нивото на кръвното налягане. При определяне на ГФ само с цистатин С и с комбинираната формула (цистатин С и креатинин) корелационните коефициенти са по-големи ($r = -0,954$ и $r = -0,760$), отколкото с кретинина.

Таблица 28: Корелационни коефициенти между ГФ и основните показатели.

Показатели	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (СКD- ЕPI) само с креатинин	eGFR (СКD- ЕPI) само с цистатин С	eGFR (СКD-ЕPI) с креатинин и цистатин С
Албумин в урината (mg/L)	-0,309***	-0,335***	-0,393***	-0,461***
Общ белтък в урината (mg/L)	-0,275**	-0,303***	-0,443***	-0,470***
АСR (mg/mmol)	-0,347***	-0,380***	-0,485***	-0,539***
РСR (mg/mmol)	-0,294***	-0,321***	-0,461***	-0,477***
Възраст (години)	-0,318***	-0,468***	-0,280**	-0,374***
ВМІ (kg/m ²)	0,105	0,094	-0,032	0,033
Давност на заболяването (години)	-0,282***	-0,319***	-0,563***	-0,562***
Общ холестерол (mmol/L)	-0,145	-0,208*	-0,332***	-0,326***
LDL-холестерол (mmol/L)	-0,060	-0,122	-0,229**	-0,210*
Триглицериди (mmol/L)	-0,254**	-0,285***	-0,414***	-0,433***
Цистатин С (mg/L)	-0,192*	-0,212**	-0,954***	-0,760***
Креатинин в кръвен серум(μmol/L)	-0,693***	-0,684***	-0,172*	-0,498***

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

От таблица 29 се вижда, че има положителна, значима корелация на систоличното кръвно налягане с албумина в урината ($r=0,322$, $p < 0,001$) и АСR ($r=0,217$, $p < 0,01$ и обратнопропорционално с ГФ оценена с участието на цистатин С ($r=-0,191$, $p < 0,05$). Диастоличното артериално налягане леко корелира само с албумина в урината ($r=0,174$, $p < 0,05$).

Таблица 29: Корелационни коефициенти между САН, ДАН и показателите албумин в урината, АСR и гломерулната филтрация при хипертониците

Показатели	САН	ДАН
Албумин в урината (mg/L)	0,322***	0,174*
ACR (mg/mmol)	0,217**	0,065
eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	-0,112	-0,009
eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	-0,106	-0,009
eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	-0,198*	0,030
eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	-0,191*	0,008

* - p<0,05,** - p<0,01,*** - p<0,001

3.6.4 Диабетици с хипертония

В тази група са включени 162 болни, които след появата на диабет тип 2, в различен интервал от време развиват и хипертония. Мъжете са 83 (51,2%), а жените 79 (48,8%) на възраст от 18 до 86 г. Средната възраст на болните е по-голяма от тази на контролите (58,54 срещу 44,53), но по ръст, тегло и ВМІ не се различават от тях (таблица 30). Давността на диабета е от 1 г. (2 болни) до 16 г. (1 болен). Преобладават болните с давност на диабета 3 г. (20 болни, 1,9%), 4 г. (23 болни, 14,2%), 5 г. (20 болни, 12,3%). При всички болни, хипертонията е регистрирана след диабета и тя е с давност от няколко месеца до 5 г.

Представените резултати на таблица 31 показват данните от вариационния анализ на изследваните показатели. Установяваме, че средните аритметични стойности са статистически значимо променени спрямо клинично здравите лица. Протеиновите показатели АСR и албумин в урината, РСR и ОБ в урината са многократно увеличени, по-силно отколкото при диабетици без хипертония и при хипертоници. АСR е увеличен над 20 пъти, албумина в урината над 3,5 пъти, РСR над 7 пъти и ОБ около 2 пъти. От липидните показатели най-изразено е увеличението на LDL-С с 61%. Увеличени са също глюкозата, гликирания хемоглобин и пикочната киселина. Статистически значимо е намалението на ГФ, изчислена по формулите включващи цистатин С.

Таблица 30: Вариационен анализ на възрастта и антропометричните характеристики при диабетици с хипертония

Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Възраст (години)	162	58,54	15,03	61,00	18,00	87,00
Ръст (см.)	162	168,60	7,65	169,00	151,00	188,00
Тегло (кг.)	162	67,31	11,19	65,00	48,00	109,00
ВМІ (кг/м ²)	162	23,71	3,79	23,34	14,90	37,26

И в групата на диабетици с хипертония се наблюдават незначими, полови разлики за албумина и общия белтък в урината с по-високи стойности за мъжете в сравнение с жените (49,81 към 41,75 и 107,25 към 102,86) (таблица 32).

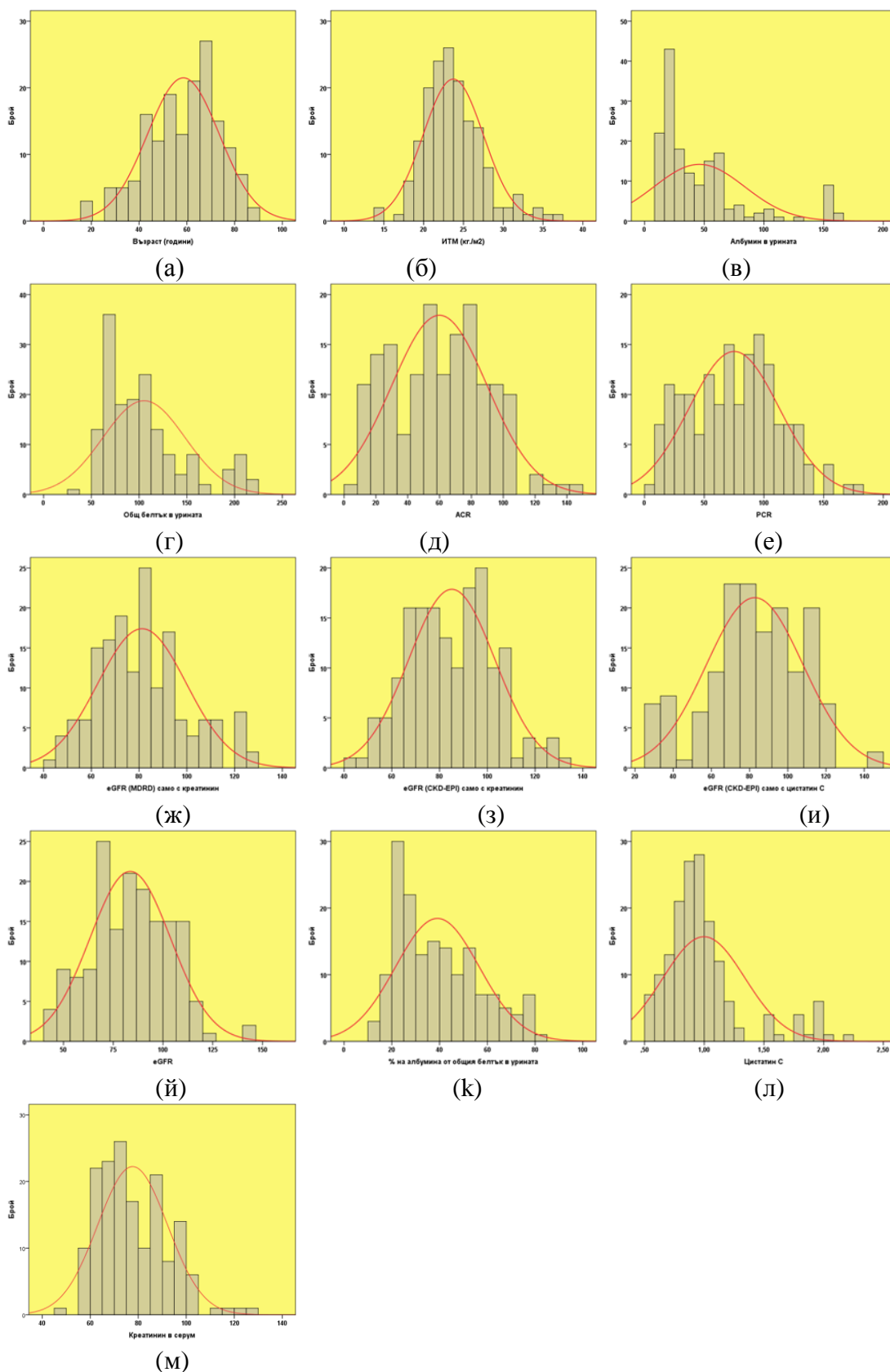
От представените на фигура 9 резултати се вижда, че Гаусово разпределение показва само ГФ, изчислена с всички формули, а останалите имат не Гаусово разпределение с изместване на кривата в различни посоки.

Таблица 31: Вариационен анализ на изследваните показатели при диабетици с хипертония

Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Цистатин С (mg/L)	162	1,00	0,34	0,95	0,53	2,21
Креатинин в урината ($\mu\text{mol/L}$)	162	4,11	3,32	2,75	1,15	16,83
Албумин в урината (mg/L)	162	45,88	37,97	32,00	9,00	166,00
Общ белтък в урина (mg/L)	162	105,11	43,06	97,00	26,00	219,00
Процент на албумина от общия белтък в урината (%)	162	39,08	17,52	35,31	11,63	82,50
ACR (mg/mmol)	162	59,89	30,04	60,49	6,50	144,35
PCR (mg/mmol)	162	75,05	37,64	75,80	8,14	180,87
Холестерол (mmol/L)	162	6,49	1,97	6,12	3,40	15,20
HDL-C (mmol/L)	162	1,14	0,24	1,14	0,54	2,31
LDL -C (mmol/L)	162	4,22	1,85	3,87	1,31	11,92
Триглицериди (mmol/L)	162	1,91	0,88	1,65	0,47	4,65
Глюкоза (mmol/L)	162	6,61	2,43	5,99	3,21	15,20
Гликиран хемоглобин (%)	162	7,08	1,72	6,50	4,50	13,20
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	162	97,64	14,53	74,15	49,00	129,90
Пикочна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	162	292,79	74,78	292,00	103,00	465,00
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	162	81,23	18,57	80,50	41,26	129,70
eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	162	85,11	18,09	84,79	43,48	131,80
eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	162	82,67	25,30	82,41	27,58	146,68
eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	162	83,53	20,27	83,36	40,51	144,20

Таблица 32: Сравнителен анализ на албумин и общ белтък в урината при двата пола

Показател	Мъже (n=83)		Жени (n=79)		p
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Албумин в урината (mg/L)	49,81	43,15	41,75	31,38	0,460
Общ белтък в урината (mg/L)	107,25	45,53	102,86	40,47	0,802



Фигура 9: Честотно разпределение при диабетици с хипертония по различни показатели (тест на Колмогоров-Смирнов): възраст, $p=0,016$ (а); BMI, $p=0,003$ (б); албумин в урината, $p<0,001$ (в); общ белтък в урината, $p<0,001$ (г); ACR, $p=0,034$ (д); PCR, $p=0,034$ (е); eGFR (MDRD), $p=0,079$ (ж); eGFR (CKD-EPI) само с креатинин, $p=0,200$ (з); eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С, $p=0,200$ (и); процент

на албумина от общия белтък в урината, $p < 0,001$) (й); цистатин С, $p < 0,001$) (к); креатинин в серум, $p < 0,001$ (л); креатинин в серум, $p < 0,001$ (м)

Таблица 33: Корелационни коефициенти между албумина в урината и някои показатели

Показател	Албумин в урината
Възраст (години)	0,121
Давност на заболяването	0,733***
ВМІ (kg/m^2)	0,046
Общ белтък в урината	0,814***
ACR	0,263**
PCR	0,263**
Цистатин С	0,514***
Креатинин в серум	0,232**
LDL-C	0,182*
Общ холестерол	0,258**

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

Таблица 34: Корелационни коефициенти между общия белтък в урината и някои показатели

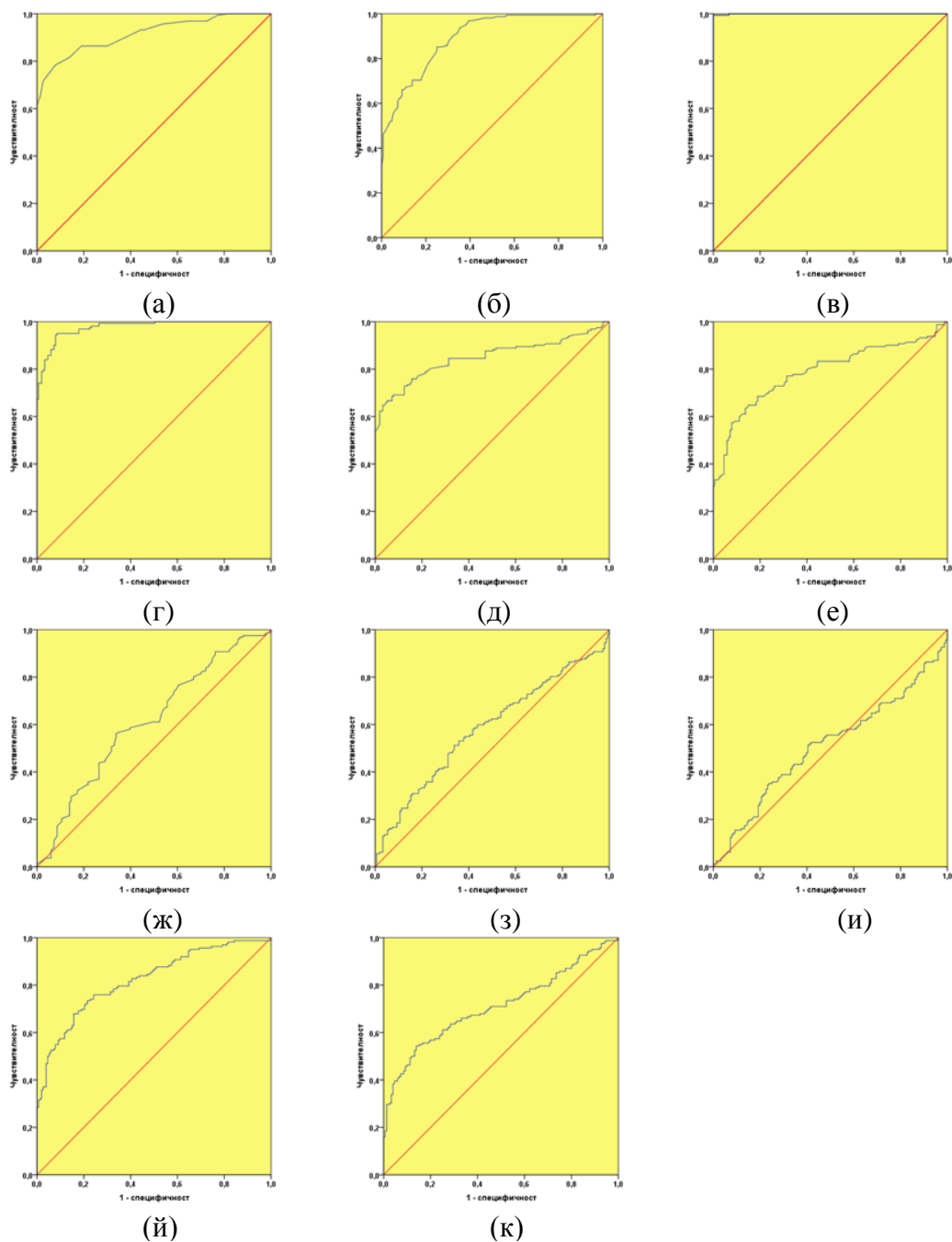
Показател	Общ белтък в урината
Възраст (години)	0,106
Давност на заболяването	0,726***
ACR	0,305***
Цистатин С	0,540***
Креатинин в серум	0,248**
Глюкоза	0,176*
Гликиран хемоглобин	0,424***

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

На таблица 33 и 34 са демонстрирани корелационните зависимости на албумина и ОБ в урината с останалите показатели. Албуминът в урината показва доста силна, положителна корелация с ОБ ($r=0,814$, $p < 0,001$), с давността на заболяването ($r=0,733$, $p < 0,001$), ACR ($r=0,263$, $p < 0,01$). Корелацията на албумина с цистатин С в серума е по-висока ($r=0,514$, $p < 0,001$) от тази с креатинина ($r=0,232$, $p < 0,01$). Добра корелация е регистрирана и с останалите показатели без ВМІ. ОБ е във висока корелация с давността на

заболяването ($r=0,726$, $p<0,001$), със серумният цистатин С ($r=0,540$, $p<0,001$) и АСR ($r=0,305$, $p<0,001$) и гликираният хемоглобин ($r=0,424$, $p<0,001$).

От представените на фигура 10 ROC криви се демонстрира диагностичната ефективност на изследваните показатели. При диабетици с хипертония особено полезен показател е АСR с площ под кривата 1 при $p<0,001$, следван от албумин в урината с площ под кривата 0,915 при $p<0,001$. ROC кривите за ГФ отново дават предимство на уравненията с цистатин С самостоятелно (с площ под кривата 0,821 при $p<0,001$) и комбинираната формула с цистатин С и креатинин (с площ под кривата 0,710 при $p<0,001$), спрямо тези само с креатинин (с площ под кривата 0,583 при $p=0,012$ с площ под кривата 0,509 при $p=0,772$). На таблица 35 са дадени характеристиките чувствителност, специфичност, предиктивни стойности и точност. Като най-добри показатели за отграничаване на диабетици с хипертония от контролите са АСR с чувствителност 100%, специфичност 93% и точност 97%, следвани от РСR с чувствителност 97%, специфичност 82% и прицизност 90. Отново впечатлява, че чувствителността, специфичността и точност в тази група са много по-високи в сравнение с групата на диабетици без хипертония и болните с есенциална хипертония. При определяне на ГФ с четирите формули, чувствителността и специфичността са много близки, но по-ниски от тези на белтъчните показатели.



Фигура 10: ROC криви за определяне праговата им стойност при отграничаването на имащите диабет + хипертония от контролната група: а/ албумин в урината (площ под кривата 0,915, $p < 0,001$); б/ общия белтък в урината (площ под кривата 0,893, $p < 0,001$); в/ ACR (площ под кривата 1,000, $p < 0,001$); г/ PCR (площ под кривата 0,977, $p < 0,001$); д/ общ холестерол (площ под кривата 0,849, $p < 0,001$); е/ цистатин С (площ под кривата 0,788, $p < 0,001$); ж/ креатинин в серум (площ под кривата 0,788, $p = 0,001$); з/ eGFR (MDRD) с креатинин (площ под кривата 0,583, $p = 0,012$); и/ eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (площ под кривата 0,509, $p = 0,772$); й/ eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (площ под кривата 0,821, $p < 0,001$); к/ eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (площ под кривата 0,710, $p < 0,001$).

Средните нива на ГФ определени с 4-те формули са по-ниски от тези в контролната група (таблица 31). С ГФ определена с комбинираното уравнение $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ са 63 болни, 38,9%; с ГФ от 89 до 60 mL/min/1.73 m^2 са 78 болни, 48,1%; от 59 до 45 са 18 болни, 11,1% и от 30 до 44 mL/min/1.73 m^2 са 3 болни, 1,9%. С ГФ под 60 mL/min/1.73 m^2 са 21 болни, 13%. И в тази група болни по-често регистрираме албинурия А2 (85 болни, 52,4%) и увеличение на АСР в сравнение с намалението на ГФ $<60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, 21 болни, 13%).

Таблица 35: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на диабетици с хипертония от здравите индивиди

Показател	Прагова величина	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	Положителна предиктивна стойност (%)	Отрицателна предиктивна стойност (%)	Точност (%)
Албумин в урината	≥ 15,5	86	70	75	83	78
Общ белтък в урината	≥ 63,5	90	68	75	87	79
ACR	≥ 6,23	100	93	94	100	97
PCR	≥ 16,35	97	82	85	96	90
Общ холестерол	≥ 5,12	81	69	74	78	76
eGFR (MDRD) само с креатинин	≥ 65,53	80	25	53	54	54
eGFR (СКD-EPI) само с креатинин	-	-	-	-	-	-
eGFR (СКD-EPI) само с цистатин С	≤ 108,68	83	59	68	76	71
eGFR (СКD-EPI) с креатинин и цистатин С	≤ 104,16	81	29	55	59	56
Цистатин С	≥ 0,75	81	56	66	74	69
Креатинин в серум	≤ 89,60	80	33	56	61	58

С албуминурия А1 са 77 болни (47,5%) и с албуминурия А2 (микроалбуминурия) са 85 болни (52,46%) (таблица 36). Албуминурия А2 се наблюдава по-често при по-възрастните и при тези с по-голяма давност на диабета и хипертонията. Нямаме болни с албуминурия А3.

Таблица 36: Сравнителен анализ на възрастта и давността на заболяването според нивата на албумин в урината

Показатели	Албумин в урината						p
	До 29 мг/л			30-300 мг/л			
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Възраст (години)	77	56,57	16,75	85	60,32	13,14	0,113
Давност на заболяването (години)	77	4,29	1,73	85	7,85	2,52	<0,001

Корелационните зависимости между ГФ и изследваните показатели са показани на таблица 37 чрез съответните корелационни коефициенти. Всички статистически значими корелации са обратнопропорционални. Високи са коефициентите на ГФ оценена с комбинираната формула (цистатин С и креатинин) с общия белтък ($r=-0,520$), с давност на заболяването ($r= -0,512$), с албумин ($r= -0,495$), с HbA1c ($r= -0,424$) и с ACR ($r=-0,345$, $p<0,001$).

Таблица 37: Корелационни коефициенти между гломерулната филтрация и някои показатели

Показатели	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (CKD-EPI) само с креатинин	eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С	eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С
Албумин в урината	-0,237**	-0,257**	-0,506***	-0,495***
Общ белтък в урината	-0,274***	-0,272***	-0,531***	-0,520***
ACR	-0,288***	-0,289***	-0,311***	-0,345***
PCR	-0,288***	-0,289***	-0,311***	-0,345***
Възраст	-0,406***	-0,609***	-0,319***	-0,440***
ВМІ	-0,118	-0,087	-0,253**	-0,229**
Давност на заболяването	-0,279***	-0,268**	-0,529***	-0,512***
НbA1c	-0,269**	-0,292***	-0,396***	-0,424***
Глюкоза	-0,215**	-0,236**	-0,306***	-0,310***
LDL-холестерол	-0,164*	-0,199*	-0,202**	-0,217**
Общ холестерол	-0,203**	-0,235**	-0,266**	-0,276***
Триглицериди	-0,107	-0,087	-0,262**	-0,234**
Цистатин С	-0,339***	-0,321***	-0,959***	-0,835***
Креатинин в кръвен серум	-0,685***	-0,642***	-0,268**	-0,458***

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

3.6.5 Хронични първични бъбречни заболявания (ХПБЗ)

Групата на болните с хронични, първични бъбречни заболявания се състои от 52 болни, от които жени 23, 44,2% и малко повече мъже 29, 55,8%. Включили сме болни с различни първични бъбречни заболявания, гломерулонефрит, пиелонефрит и калкулоза.

Таблица 38: Вариационен анализ на възрастовите и антропометричните показатели при ХПБЗ

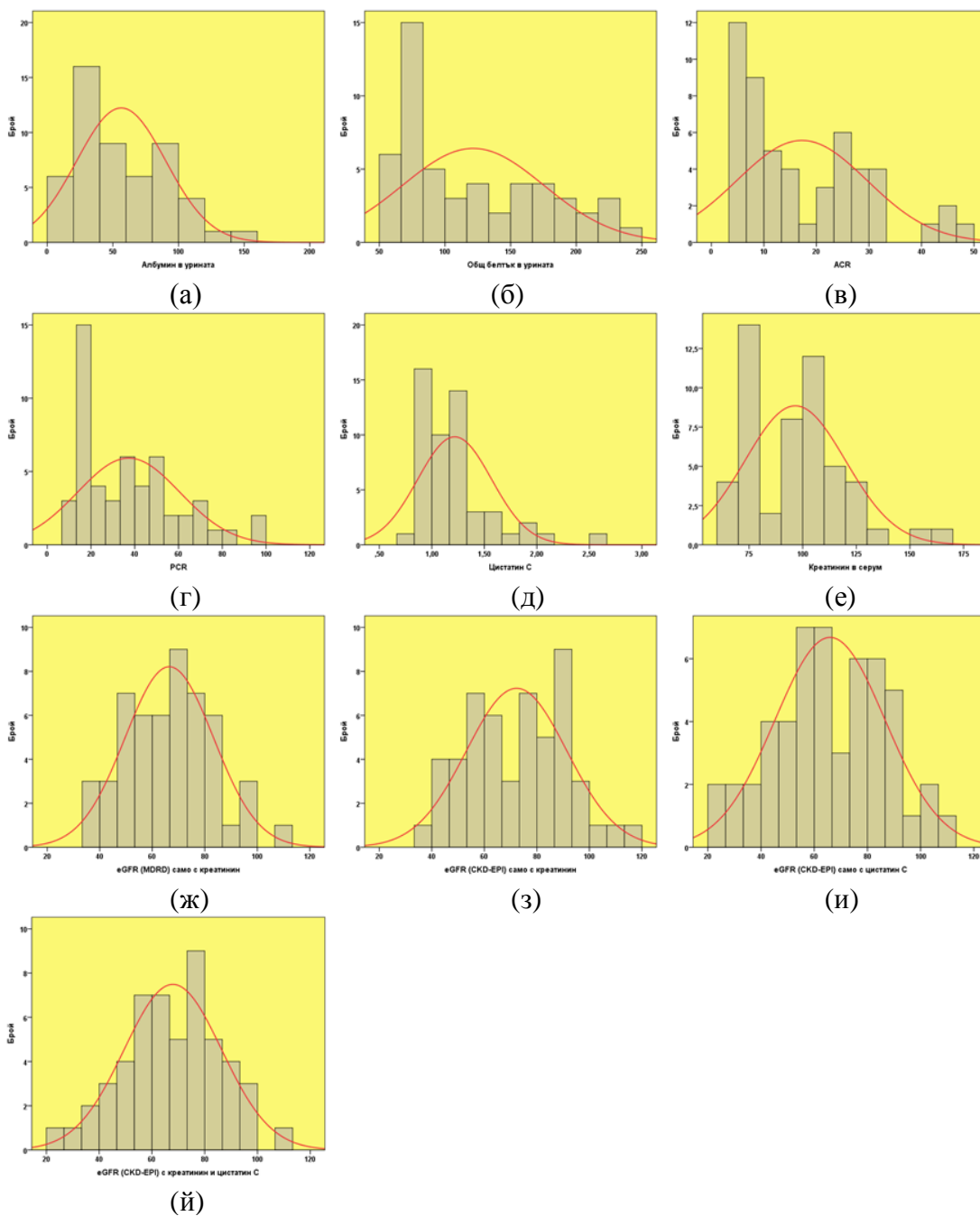
Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Възраст (години)	52	55,12	14,13	56,00	24,00	82,00
Ръст (см.)	52	167,34	7,73	165,50	146,00	188,00
Тегло (кг.)	52	74,18	18,35	71,50	47,00	140,00
ИТМ (кг/м ²)	52	26,33	5,42	25,96	15,89	43,21

Средната възраст, тегло и ВМІ са по-големи в сравнение с контролите (табл. 38).

Само креатининът в серума и ГФ, изчислена по 4-те формули, имат Гаусово разпределение (фигура 11). Останалите показатели имат не Гаусово разпределение. Хистограмата на някои от показателите е изместена леко в дясно.

Всички изследвани показатели показват статистически значими промени на средните стойности спрямо контролите (табл. 39). Това увеличение е за цистатин С 64,8%; за серумния креатинин 25,6%; албумина в урината 4,4 пъти; за ACR 7 пъти; за PCR 3,5 пъти, за общ холестерол 22,45% и за пикочната киселина 32,9%. ГФ при болните от ХПБЗ е значимо намалена спрямо контролите. В проценти това намаление е с MDRD формулата само с креатинин 14,7%, с СКД-ЕPI само с креатинин 17,3%, само с цистатин С 66,5% и с комбинираната формула 43,6%.

Корелацията между креатинин и цистатин С в серума е умерена и правопрпорционална (Spearman's, $\rho=0,420$, $p=0,002$). Корелацията на албумина и ОБ в урината с останалите показатели е представена на таблица 40



Фигура 11: Честотно разпределение на болните с ХПБЗ по: а/ албумин в урината (не Гаусово, $p=0,011$); б/ общ белтък в урината (не Гаусово, $p<0,001$); в/ ACR (не Гаусово, $p<0,001$); г/ PCR (не Гаусово, $p<0,001$); д/ цистатин С (не Гаусово, $p<0,001$); е/ креатинин в серум (Гаусово, $p=0,059$); ж/ eGFR (MDRD) само с креатинин (Гаусово, $p=0,200$); з/ eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (Гаусово, $p=0,200$); и/ eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (Гаусово, $p=0,200$); й/ eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (Гаусово, $p=0,200$).

Таблица 39: Вариационен анализ на изследваните показатели при пациентите с ХПБЗ

Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Цистатин С (mg/L)	52	1,22	0,35	1,12	0,78	2,56
Креатинин в урината (mmol/L)	52	3,87	1,54	3,70	1,19	8,44
Албумин в урината (mg/L)	52	56,35	33,93	51,00	17,00	150,00
Общ белтък в урина (mg/L)	52	121,50	53,92	99,00	55,00	240,00
Процент на албумина от общия белтък в урината (%)	52	43,53	11,35	45,37	24,05	68,18
ACR (mg/mmol)	52	17,25	12,43	13,41	3,52	46,67
PCR (mg/mmol)	52	37,22	23,37	35,12	11,19	100,00
Холестерол (mmol/L)	52	5,78	0,89	5,69	4,12	8,21
Триглицериди (mmol/L)	52	1,89	0,60	1,96	0,69	3,10
HDL-C (mmol/L)	52	1,02	0,21	1,00	0,63	1,56
Глюкоза (mmol/L)	52	4,68	0,82	4,94	3,12	5,98
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	52	96,52	23,43	96,50	63,00	169,00
Пикочна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	52	341,40	71,17	340,00	205,00	520,00
LDL-C (mmol/L)	52	3,07	0,58	3,05	2,01	4,98
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	52	66,48	16,84	67,37	34,91	110,82
eGFR (СКД-EPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	52	72,28	19,13	73,89	34,48	115,46
eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	52	65,94	20,70	65,22	21,34	111,05
eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	52	67,93	18,47	67,67	26,31	108,43

Таблица 40: Корелационни коефициенти между албумин и общ белтък в урината с основните показатели.

Показател	Албумин в урината	Общ белтък в урината
Възраст (години)	0,181	0,143
ВМІ (kg/m ²)	-0,026	-0,017
Давност на заболяването (години)	0,650***	0,640***
Общ белтък в урината (mg/L)	0,939***	1,000***
ACR (mg/mmol)	0,822***	0,792***
PCR (mg/mmol)	0,724***	0,759***
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	-0,160	-0,159
eGFR (СКD-EPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	-0,190	-0,183
eGFR (СКD-EPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	-0,502***	-0,486***
eGFR (СКD-EPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	-0,390**	-0,387**

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

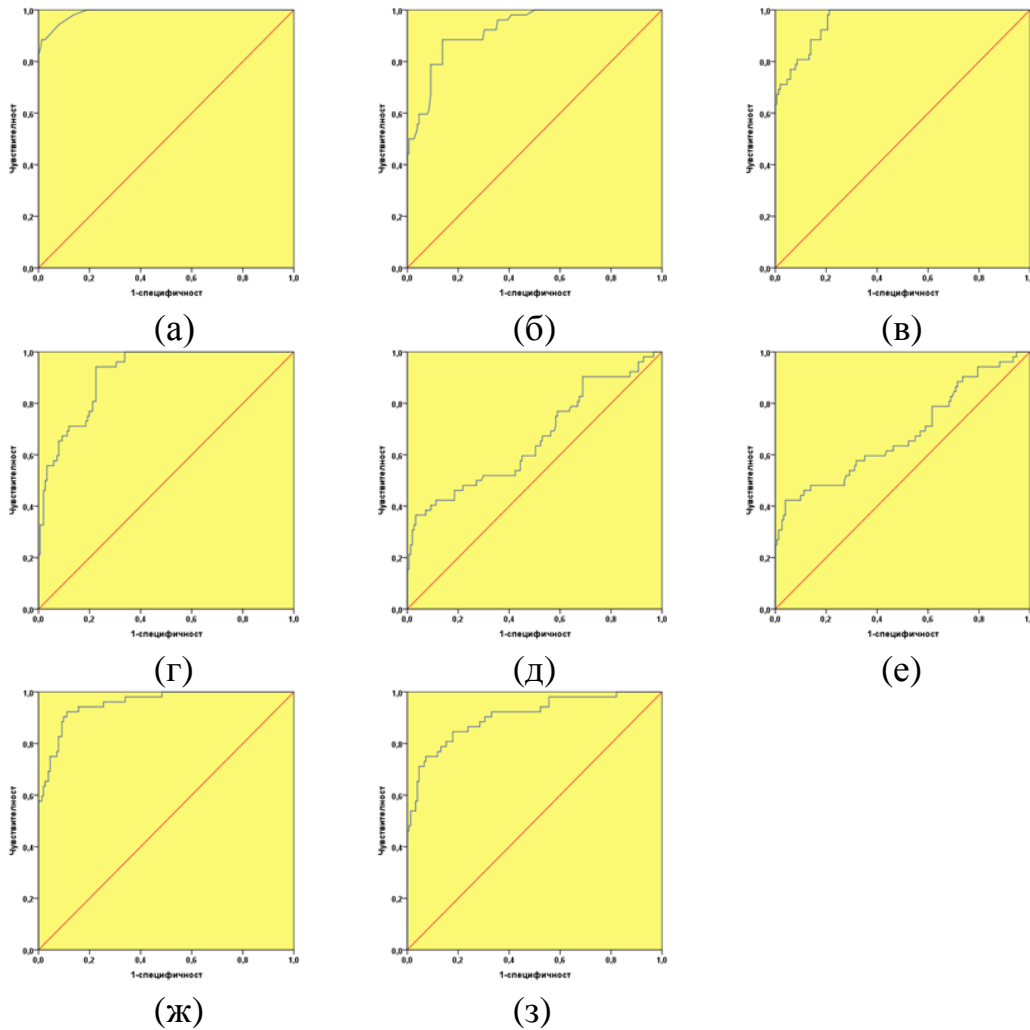
Резултатите от табл. 40 показват, че албуминът в урината най-силно правопрпорционално корелира с ОБ в урината ($r=0,939$, $p<0,001$) и след това с ACR ($r=0,822$, $p<0,001$), с PCR ($r=0,724$, $p<0,001$), с давност на заболяването ($r=0,650$, $p<0,001$) и обратнопропорционално с ГФ (по последните две формули), като малко по-силна е корелацията с ГФ, изчислена по формулата само с цистатин С ($r=-0,502$, $p<0,001$). Корелацията на ОБ в урината със същите показатели демонстрира подобни резултати (табл. 40).

Таблица 41: Корелационни коефициенти между ГФ и основните показатели

Показатели	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (СКД-ЕПІ) само с креатинин	eGFR (СКД-ЕПІ) само с цистатин С	eGFR (СКД-ЕПІ) с креатинин и цистатин С
Възраст (години)	-0,367**	-0,479***	-0,518***	-0,522***
ВМІ (kg/m ²)	-0,135	-0,173	-0,025	-0,081
Давност на заболяването (години)	-0,637***	-0,667***	-0,842***	-0,849***
Общ белтък в урината (mg/L)	-0,159	-0,183	-0,486***	-0,387**
ACR (mg/mmol)	-0,267	-0,305*	-0,457**	-0,426**
PCR (mg/mmol)	-0,272	-0,311*	-0,398**	-0,395**

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Представените резултати на таблица 41 показват отрицателна корелационна зависимост между ГФ, изчислена с различните формули и представените показатели: по-силна е корелацията на ГФ с формулата само с цистатин и с комбинираната в сравнение с уравненията само с креатинин при давност на заболяването ($r=-0,849$ спрямо $r=-0,637$), както и с възрастта на болните ($r=-0,522$ спрямо $r=-0,367$). По отношение на протеиновите показатели корелацията е най-висока с АСR, следва РСR и ОБ.



Фигура 12: ROC криви на: а/ албумина в урината (площ под кривата 0,989, $p < 0,001$); б/ общия белтък в урината (площ под кривата 0,923, $p < 0,001$); в/ ACR (площ под кривата 0,959, $p < 0,001$); г/ PCR (площ под кривата 0,912, $p < 0,001$); д/ eGFR (MDRD) само с креатинин (площ под кривата 0,660, $p = 0,001$); е/ eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (площ под кривата 0,681, $p < 0,001$); ж/ eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (площ под кривата 0,955, $p < 0,001$); з/ eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (площ под кривата 0,905, $p < 0,001$).

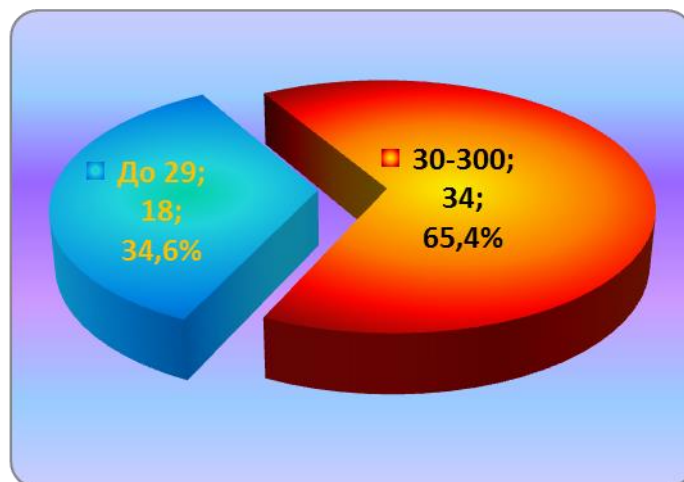
Представените ROC криви (фиг. 12) показват диагностичната точност на изследваните белтъчни показатели в урината. Статистически значими прагови стойности се установяват почти за всички показатели. При изборът на прагова величина критериите за оптимизация са висока чувствителност, специфичност и точност. С най-голяма диагностична точност е албуминът в урината (а), чиято площ под кривата се доближава до единица (0,989, $p < 0,001$) и ACR (в) (0,959, $p < 0,001$). При болните с ХПБЗ диагностичната точност на ГФ е много близка до тази на белтъците в урината. От 4-те уравнения за оценка на ГФ най-висока стойност показва това, което е само с цистатин С (г) (площ под кривата 0,955, $p < 0,001$) и комбинираната формула с цистатин С и креатинин (з) (0,905, $p < 0,001$).

Като най-добър показател за отграничаване на болните с ХПБЗ от клинично здравите индивиди се установи албуминът в урината с чувствителност 94%, точност 93% и специфичност 92%, следван от ACR с чувствителност 98%, точност 84% и специфичност 79%. ГФ с уравнението само с цистатин С е с чувствителност 94%, точност 87% и специфичност 84%, следвано от комбинираната формула с цистатин С и креатинин с чувствителност 85%, точност 83% и специфичност 82%. ГФ определена само с креатинин е с най-ниска чувствителност 81% и точност 45%. Положителната и отрицателната предиктивни стойности отново са най-високи за албумина и ACR (табл. 42).

Таблица 42: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на пациентите с ХПБЗ от здравите индивиди

Показател	Прагова величина	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	Положителна предиктивна стойност (%)	Отрицателна предиктивна стойност (%)	Точност (%)
Албумин в урината (mg/L)	≥ 18,5	94	92	80	98	93
Общ белтък в урината (mg/L)	≥ 73,5	88	86	69	96	87
ACR (mg/mmol)	≥ 3,53	98	79	61	99	84
PCR (mg/mmol)	≥ 13,61	94	78	59	98	82
eGFR (MDRD) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	≤ 81,54	83	33	30	85	46
eGFR (СКД-ЕPI) само с креатинин (ml/min/1.73mm ²)	≤ 91,75	81	33	29	83	45
eGFR (СКД-ЕPI) само с цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	≤ 94,81	94	84	67	98	87
eGFR (СКД-ЕPI) с креатинин и цистатин С (ml/min/1.73mm ²)	≤ 85,45	85	82	62	94	83

Средните нива на ГФ, определени с 4-те формули, са по-ниски от тези в контролната група. С ГФ $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ са 7 болни, 13,5%; с ГФ от 89 до 60 mL/min/1.73 m^2 са 27 болни, 51,9%; с от 59 до 45 са 12 болни, 23,1%, с от 30 до 44 са 5 болни, 9,6% и 1 болен (1,9%) има ГФ $28 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. С ГФ под 60 mL/min/1.73 m^2 са 18 болни, 34,6%. Най-много болни са със стойностите от 60 до 89 mL/min/1.73 m^2 , 51,9%.



Фигура 13 : Честотно разпределение на болните с албуминурия

От фиг. 13 става ясно, че с албуминурия А1 са 18 болни, 35%, а с албуминурия А2 - 34 болни, 65%. Абнормална албуминурия А2 установяваме при повече болни спрямо тези с намалена ГФ $< 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, 18 болни, 34,6%.

3.6.6 Сравнителен анализ на отделните групи

Представените в този раздел резултати са обобщаващи за 4-те групи в сравнение с клинично здравите лица. На табл. 43 е представено разпределението по пол, средни стойности на възраст и антропометрични характеристики за отделните групи и общо.

Таблица 43: Изследван контингент

Група	Брой (общо)	Мъже	Жени	Възраст	Тегло (средно)	Ръст (среден)	ВМІ (средно)
Контроли	153	63	90	20 - 77	65.74	165.71	23.91
Диабетици без хипертония	152	80	72	24 – 82 ($\bar{X}=55.12$)	74.18	167.34	26.33
Диабетици с хипертония	162	83	79	18 – 86 ($\bar{X}=58.54$)	67.31	168.60	23.71
Хипертоници	150	65	85	21 – 74 ($\bar{X}=49.85$)	49.85	167.83	26.14
ХПБЗ	52	29	23	25 – 71 ($\bar{X}=53.35$)	71.50	168.48	25.05
Общо	669	320	349	20 - 86	49 - 71		23.71- 26.33

Резултатите на таблица 44 показват, че е налице статистически значима албуминурия при всички групи спрямо клинично здравите лица. Тя е предимно албуминурия А2 и е най-висока при болни с ХПБЗ ($\bar{X}=56,35\pm 33,93$) и най-ниска при хипертониците ($\bar{X}=31,26\pm 19,37$). Същата характеристика показва и протеинурията, най-висока при ХПБЗ ($\bar{X}=121,5\pm 53,92$) и най-ниска при хипертониците ($\bar{X}=89,1\pm 32,13$). Екскрецията на албумина с урината остава в референтните граници само при 3,8% от ХПБЗ, при 32% от диабетите с хипертония, при 31,1% от хипертониците и при 24,7% от диабетите без хипертония. АСР е най-силно увеличено при диабетци с хипертония, следвано от ХПБЗ. Процентът на албумина от общия белтък е увеличен при всички групи спрямо контролите, както и АСР и РСР. Цистатин С и креатинин в кръвен серум са най-високи при ХПБЗ ($\bar{X}=1,22\pm 0,35$ и $\bar{X}=96,52\pm 23,43$ съответно). Общият холестерол и LDL-C са най-високи в групата диабет с хипертония.

Таблица 44: Сравнителен анализ на изследваните групи по някои показатели

Показатели	Група	Брой	\bar{X}	SD
Албумин в урината	Контроли	153	12,92 ^a	4,05
	Диабетици	150	51,43 ^{bd}	67,46
	Хипертоници	148	31,26 ^b	19,37
	Диабет + хипертония	162	45,88 ^{cd}	37,97
	ХПБЗ	52	56,35 ^e	33,93
Общ белтък в урината	Контроли	152	54,39 ^a	19,24
	Диабетици	152	118,01 ^{bd}	145,68
	Хипертоници	147	89,10 ^b	32,13
	Диабет + хипертония	162	105,11 ^{cd}	43,06
	ХПБЗ	52	121,50 ^e	53,92
Креатинин в кръвен серум	Контроли	151	83,47 ^a	15,44
	Диабетици	152	86,97 ^a	21,07
	Хипертоници	150	80,56 ^b	17,09
	Диабет + хипертония	162	77,64 ^b	14,53
	ХПБЗ	52	96,52 ^c	23,43
Цистатин С	Контроли	153	0,74 ^a	0,11
	Диабетици	152	1,03 ^b	0,28
	Хипертоници	149	0,95 ^{bd}	0,20
	Диабет + хипертония	162	1,00 ^{cd}	0,34
	ХПБЗ	52	1,22 ^e	0,35
Общ холестерол	Контроли	153	4,72 ^a	0,60
	Диабетици	152	5,98 ^b	1,11
	Хипертоници	150	5,96 ^b	1,30
	Диабет + хипертония	162	6,49 ^c	1,97
	ХПБЗ	52	5,78 ^b	0,89
LDL-холестерол	Контроли	153	2,62 ^a	0,44
	Диабетици	152	3,72 ^b	1,00
	Хипертоници	150	3,82 ^{bd}	1,19
	Диабет + хипертония	162	4,22 ^{cd}	1,85
	ХПБЗ	52	3,07 ^e	0,58
HDL-холестерол	Контроли	153	1,15 ^a	0,16
	Диабетици	152	1,07 ^b	0,24
	Хипертоници	150	1,06 ^b	0,19
	Диабет + хипертония	162	1,14 ^a	0,24
	ХПБЗ	52	1,02 ^b	0,21

* - еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

Таблица 45: Сравнителен анализ на изследваните групи по ГФ

Показатели	Група	Брой	\bar{X}	SD
eGFR (MDRD) само с креатинин	Контроли	151	76,24 ^a	14,15
	Диабетици	152	73,55 ^a	17,31
	Хипертоници	150	79,19 ^b	18,46
	Диабет + хипертония	162	81,23 ^b	18,57
	ХПБЗ	52	66,48 ^c	16,84
eGFR (СКD-EPI) само с креатинин	Контроли	151	84,83 ^{ac}	15,31
	Диабетици	152	79,51 ^{bc}	19,46
	Хипертоници	150	86,45 ^a	19,44
	Диабет + хипертония	162	85,11 ^{ac}	18,09
	ХПБЗ	52	72,28 ^b	19,13
eGFR (СКD-EPI) само с цистатин С	Контроли	153	109,81 ^a	15,05
	Диабетици	152	78,97 ^b	25,06
	Хипертоници	149	85,60 ^{cd}	21,02
	Диабет + хипертония	162	82,67 ^{bd}	25,30
	ХПБЗ	52	65,94 ^e	20,70
eGFR (СКD-EPI) с креатинин и цистатин С	Контроли	151	97,52 ^a	13,20
	Диабетици	152	78,52 ^b	20,07
	Хипертоници	149	85,56 ^c	17,58
	Диабет + хипертония	162	83,53 ^c	20,27
	ХПБЗ	52	67,93 ^d	18,47

* - еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

ГФ установена с различните формули в отделните групи е дадена в таблица 45. На нея може да се види разликата в ГФ установена с различните уравнения. Както се и очаква най-висока е ГФ в контролната група оценена с формулата само с цистатин С ($\bar{X} = 109,81 \text{ mL/min/1.73 m}^2$). При болните най-ниска е ГФ в групата на ХПБЗ ($65,94 \text{ mL/min/1.73 m}^2$). Тук много ясно проличава надценяване и подценяване на ГФ при изчисление с формули с участието на креатинина (MDRD и СКD-EPI) спрямо уравненията с цистатин С. Стандартните отклонения при различните групи болни са най-големи при ГФ определена с формулата само с цистатин С. Това показва, че честотното разпределението с цистатин С е най-широко и включва от най-ниски до най-високи стойности.

Половата разлика за ГФ е представена на таблица 46. Статистически значима е половата разликата на ГФ с по-високи стойности за мъжете в контролната група, при хипертониците и при диабетиците с хипертония.

Всички статистически достоверни корелации са правопрпорционални (табл. 47). При контролната група липсва корелацията между креатинина и цистатин С в серума ($r=0,083$, $p \geq 0,05$), но с останалите групи корелацията става все по-силна - при хипертоници ($r=0,221$, $p < 0,01$), при диабетици ($r=0,246$, $p < 0,01$), при диабетици с хипертония ($r=0,328$, $p < 0,01$) и при болни с ХПБЗ ($r=0,420$, $p < 0,001$).

На табл. 48 се вижда, че:

- В групата на контролите жените имат сигнификантно по-висока средна стойност от тази на мъжете при показателите албумин в урината и ACR;
- В групата на диабетиците мъжете имат значимо по-висока средна стойност от тази на жените при показателя ACR;
- В останалите три групи статистически достоверна разлика между двата пола по разглежданите показатели не се установява.

Разпределението на ГФ според класифицирането на стadiите на ХБЗ е представено на таблица 49. Тук отново се демонстрира разликата между отделните формули за изчисляване на ГФ. Още в контролната група проличава тази разлика. В контролната група броят на индивидите с ГФ $> 90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ са 23, 15,2% (с MDRD); 53, 35,1% (с СКД-ЕРІ с креатинин); 134, 87,6% (СКД-ЕРІ само с цистатин С); и 111, 73,5% (СКД-ЕРІ с креатинин и цистатин С). Всички контроли са с ГФ $> 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. При контролите съгласно първите две уравнения по-голям е броя на индивидите с ГФ 60 - 89 mL/min/1.73 m^2 . Според последните две формули повече от клинично здравите лица са с ГФ $> 90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Подобни разминавания се установяват и при болните (таблица 49). При класифициране на болните съгласно приетите норми за ГФ при ХБЗ с комбинираната формула установяваме: Степен IIIa са 28 болни с диабет без регистрирана хипертония, 18,4%; 8 болни с хипертония, 5,4%; 18 болни с диабет и хипертония, 11,1% и 12 болни с ХПБЗ, 23,1%. Степен IIIb са 4 болни с диабет без хипертония, 2,6%; 5 болни с хипертония, 1,3%; 3 болни с диабет и хипертония, 1,9% и 5 болни с ХПБЗ, 9,6%. Степен IV има само един болен с ХПБЗ, 1,9%.

Таблица 46: Сравнителен анализ на ГФ при двата пола

Група	Показател	Мъже			Жени			p
		n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Контроли	eGFR (MDRD) само с креатинин	63	77,24	13,63	90	75,52	14,54	0,351
	eGFR (CKD-EPI) само с креатинин	63	83,56	13,31	90	85,73	16,57	0,551
	eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С	63	112,31	15,51	90	108,05	14,54	0,039
	eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С	63	98,69	12,48	90	96,67	13,71	0,356
Дабетици	eGFR (MDRD) само с креатинин	80	74,91	18,10	72	72,03	16,38	0,831
	eGFR (CKD-EPI) само с креатинин	80	78,90	19,27	72	80,20	19,77	0,682
	eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С	80	78,92	24,74	72	79,03	25,58	0,980
	eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С	80	78,62	19,94	72	78,41	20,34	0,950
Хипертонии	eGFR (MDRD) само с креатинин	65	87,51	16,65	85	72,82	17,29	<0,001
	eGFR (CKD-EPI) само с креатинин	65	93,33	16,54	85	81,19	19,94	<0,001
	eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С	65	88,08	20,18	85	83,67	21,57	0,150
	eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С	65	90,68	16,15	85	81,59	17,70	0,004
Диабет + хипертония	eGFR (MDRD) само с креатинин	83	88,06	19,34	79	74,06	14,71	<0,001
	eGFR (CKD-EPI) само с креатинин	83	90,03	17,94	79	79,94	16,86	<0,001
	eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С	83	85,55	27,74	79	79,64	22,22	0,138
	eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С	83	87,79	21,92	79	79,06	17,43	0,006
ХБН	eGFR (MDRD) само с креатинин	29	67,96	18,36	23	64,61	14,91	0,789
	eGFR (CKD-EPI) само с креатинин	29	72,31	20,52	23	72,24	17,68	0,993
	eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С	29	69,45	21,86	23	61,51	18,66	0,172
	eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С	29	70,27	19,73	23	64,98	16,70	0,309

Таблица 47: Корелационен анализ между креатинин и цистатин С в серума при различните групи

Показател	Група	Цистатин С
Креатинин в серума	Контролна	0,083
	Диабетици	0,246**
	Хипертоници	0,221**
	Диабет + хипертония	0,328***
	ХПБЗ	0,420**

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

Таблица 48: Погрупов сравнителен анализ на албумин, общ белтък в урината и ACR при двата пола

Група	Показател	Мъже			Жени			p
		n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Контроли	Албумин в урината	63	12,11	3,53	90	13,48	4,31	0,035
	Общ белтък в урината	63	53,60	16,57	89	54,96	21,01	0,896
	ACR	63	2,16	1,79	88	2,70	1,97	0,023
Дабетици	Албумин в урината	78	56,06	68,38	72	46,42	66,56	0,119
	Общ белтък в урината	80	127,23	147,70	72	107,78	143,73	0,133
	ACR	77	17,52	24,02	71	12,79	20,17	0,049
Хипертоници	Албумин в урината	63	31,79	19,14	85	30,87	19,65	0,499
	Общ белтък в урината	63	91,71	32,43	84	87,13	31,95	0,126
	ACR	65	8,03	7,99	85	9,14	8,85	0,309
Диабет + хипертония	Албумин в урината	83	49,81	43,15	79	41,75	31,38	0,460
	Общ белтък в урината	83	107,25	45,53	79	102,86	40,47	0,802
	ACR	83	60,43	31,33	79	59,32	28,82	0,815
ХБН	Албумин в урината	29	53,52	30,82	23	59,91	37,88	0,593
	Общ белтък в урината	29	114,28	47,56	23	130,61	60,88	0,276
	ACR	29	16,95	12,79	23	17,62	12,23	0,796

Таблица 49: Разпределение по нива на гломерулна филтрация и групи на изследване

Формула	Група	Нива на ГФ									
		15-29		30-44		45-59		60-89		90+	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
eGFR (MDRD) само с креатинин	Контроли	0	0,00	0	0,00	11	7,30	117	77,50	23	15,20
	Диабетици	1	0,70	9	5,90	20	13,20	100	65,80	22	14,50
	Хипертоници	0	0,00	5	3,30	18	12,00	82	54,70	45	30,00
	Диабет + АХ	0	0,00	1	0,60	16	9,90	97	59,90	48	29,60
	ХБН	0	0,00	6	11,50	13	25,00	28	53,80	5	9,60
eGFR (СКД-ЕРІ) само с креатинин	Контроли	0	0,00	0	0,00	2	1,30	96	63,60	53	35,10
	Диабетици	1	0,70	7	4,60	17	11,20	78	51,30	49	32,20
	Хипертоници	0	0,00	5	3,30	13	8,70	64	42,70	68	45,30
	Диабет + АХ	0	0,00	1	0,60	11	6,80	80	49,40	70	43,20
	ХБН	0	0,00	5	9,60	11	21,20	25	48,10	11	21,20
eGFR (СКД-ЕРІ) само с цистатин C	Контроли	0	0,00	0	0,00	0	0,00	19	12,40	134	87,60
	Диабетици	0	0,00	11	7,20	34	22,40	61	40,10	46	30,30
	Хипертоници	0	0,00	5	0,70	13	8,70	80	53,70	55	36,90
	Диабет + АХ	4	2,50	14	8,60	10	6,20	70	43,20	64	39,50
	ХБН	2	3,80	6	11,50	13	25,00	27	51,90	4	7,70
eGFR (СКД-ЕРІ) с креатинин и цистатин C	Контроли	0	0,00	0	0,00	0	0,00	40	26,50	111	73,50
	Диабетици	0	0,00	4	2,60	28	18,40	72	47,40	48	31,60
	Хипертоници	0	0,00	5	1,30	8	5,40	84	56,40	55	36,90
	Диабет + АХ	0	0,00	3	1,90	18	11,10	78	48,10	63	38,90
	ХБН	1	1,90	5	9,60	12	23,10	27	51,90	7	13,50

Това проучване е осъществено с цел въвеждане и използване на нови биомаркери у нас за ранна диагноза на ХБЗ в резултат на диабет тип 2, есенциална хипертония и различни хронифицирани първични бъбречни заболявания. То е основано на **669 индивиди, от които 153 клинично здрави лица (контролна група) и 516 болни.** За реализацията на тази цел въведохме и валидирахме достатъчно чувствителни и специфични методи за новия маркер цистатин С (PETA) в кръвен серум, албумин (имунотурбидиметрия) и общ белтък в урината, както и ACR, PCR и процент на албумина от общия белтък в урината, които показаха много добра **аналитична надеждност.** За определяне на клиничната надеждност на цистатин С използвахме четири нови (от 2009 до 2013 г.) уравнения (MDRD и СКD-EPI) за изчисления на ГФ и го сравнихме с досега използвания креатинин. При използването на тези методи интерференцията от ендогенни и екзогенни компоненти е сведена до минимум. За оценка на албуминурията използвахме препоръките на KDF и СКD/KDIGO 2012-2013 г. за определяне на концентрацията в средна порция на еднократна сутрешна урина и я класифицирахме в А1 (нормална) А2 (известна като микроалбуминурия) и А3 (макроалбуминурия). Освен това въведохме съотношение албумин към креатинин (**ACR**), което се приема, че има 100% чувствителност и специфичност за албуминурия А2. Индивидуалната вариация (CVi) на албумин в урината стига до 28-37%, а тази на ACR 10-12%. Среден CV <15% за албумина и <10% за ACR се смята за приемлив от НКDEP/IFCC. Проследихме ОБ и съотношението протеини/креатинин (**PCR**), както и процентът на албумина от ОБ. Протеиновите маркери са много ценни за ранно установяване на повишен пермеабилитет на ГФМ. Създадохме **собствени референтни граници от 153 клинично здрави лица** за показателите, които използвахме. След оценка на аналитичните и клиничните характеристики на експлоатационните качества на цистатин С и албуминурията определихме референтни интервали за възрастни. На база получените резултати установихме, че албуминът не е основен компонент на общия белтък, поне при здрави индивиди. В контролната група **процентът на албумина** от ОБ е средно 26,14 и **ACR** е средно 2,47. Референтните граници за цистатин С в серума при възрастни са от 0.50 до 1.02, средно **0,74±0,11mg/l**. Намираме, че **креатинин-цистатин С уравнението за ГФ е по-ефективно** от прилагането на уравнения, които използват самостоятелно креатинин или цистатин С. Нашите проучвания показват, че протеиновите показатели, съгласно диагностичната им ефективност се подреждат в следната последователност: **ACR, екскреция на албумин, процент на албумина от ОБ, PCR и накрая ОБ.** Преди всичко проследихме тези биомаркерите при **диабет тип 2** със и без регистрирана хипертония. **В литературата не намерихме разделяне на диабетиците без и със хипертония.** Добре известно е, че диабетна нефропатия е едно от най-значимите дългосрочни усложнения и е причина за над половината от всички случаи на ТБН. Установихме, че начална ДН се открива с албуминурия А2, висок ACR и висок % албумин от ОБ. Всички **протеинови показатели** са значимо увеличени при диабетиците, по-силно при тези с хипертония. **Доказваме албуминурия А2 доста рано,** още в първи и втори стадии на ХБЗ,

пет години след регистрация на заболяването. Диагностичната точност на белтъчните показатели е потвърдена от статистическите анализи и ROC кривите. При нашите диабетици промените в протеиновите маркери много често предшестват намалението на ГФ. В целия диапазон намалението на ГФ, най-точно отчитаме с комбинираната формула. Приемаме, че появата на **хипертония при диабет тип 2** е допълнителен **отежняващ** фактор за развитието на ДН и затова промените са по-силно изразени. Проследихме биомаркерите и при 150 болни с **първичната (есенциалната) хипертония**, която е другият важен фактор за ХБЗ, заедно с диабета. У нас относителният дял на хипертониците е трайно висок - 21.3%. Албуминурия **A2** регистрирахме при **59 болни, 39,9%**. Намираме по-висока албуминурия A2 и ACR при мъжете, което обясняваме и с по-висок BMI, с намален HDL-C, увеличен LDL-C и с по-високо систолично и диастолично кръвно налягане спрямо жените. Годишен скрининг за албуминурия A2, ACR и % албумин е желателно да се провежда и у нас, защото е прост, евтин, лесен за изпълнение. За сравнение изследвахме и **52 болни, 23 жени и 29 мъже** с леко хронично бъбречно заболяване в резултат на гломерулонефрит, пиелонефрит и калкулоза. Увеличението на белтъчните показатели (албумин и ОБ в урината, ACR, PCR и % албумин), цистатин С и креатинин в серума и намалението на ГФ са най-силно изразени в тази група.

Поради по-трудната и по-скъпата оценка на ГФ с екзогенни маркери (напр. инулин) предпочетохме анализ на креатинина и цистатин С. Първият е много добре познат и доста критикуван, а вторият е в процес на проучване и му се възлагат големи надежди. **Нашето проучване се включва в хипотезата за проверка ролята на цистатин С, самостоятелно или в комбинация с креатинина** при болни с ХБЗ следствие на диабет и хипертония, като използвахме четири уравнения в които задължително се включват пол, възраст и етническа принадлежност. **Референтните стойности на изчислената ГФ в контролната група** с различните формули са от **74,26 (с MDRD) до 109,81 mL/min/1,73m²** (само с цистатин С) (таблица 6). Ние смятаме за най-приемливи стойностите получени с комбинираното уравнение (97,51 mL/min/1,73m²). **В групата на диабетиците без или с хипертония, ГФ е намалена по приемливо с комбинираното уравнение в целия диапазон. С намалена ГФ <60 mL/min/1,73m² са 21,1%**. Най-голяма е групата на болните попадащи във II-и стадий на ХБЗ следвани от IIIа стадий. Съчетанието на албуминурия с намалена ГФ още повече засилва риска от ССЗ и преждевременна смъртност. В групата ни на болни с есенциална хипертония с намалена ГФ <60 mL/min/m² са 7,3% Най-голяма е групата на болните попадащи във II-и стадий на ХБЗ (84 болни, 56,4 %). **Представените ROC криви (фигура 12)** категорично потвърждават по-добрата диагностична точност за ГФ оценена с уравненията с участието на креатинин и цистатин С в сравнение само с креатинин (вижте площта под кривите). С намалена ГФ <60 mL/min/1,73m² са 34,6%. Ние установихме и чрез анализ на **ROC кривите, че цистатин С превъзхожда креатинин за откриване на намалена ГФ. Цистатин С е по чувствителен маркер за откриване на истинско бъбречно увреждане, в сравнение със серумния креатинин.**

Хронична бъбречна недостатъчност дефинирана, като намалена бъбречна функция ($\text{ГФ} < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$) и/или доказателства за увреждане на бъбреците (установена албуминурия или протеинурия) за период от най-малко три месеца е голям проблем и за нашата страна. Не всички пациенти с ХБЗ в ранните стадии имат намалена ГФ и значителна част могат да бъдат открити само чрез оценка на албуминурия или протеинурия. В потвърждение на това са и нашите резултати при четирите групи болни. Докато албуминурията респ. протеинурията се препоръчва да се проследява през 3-4 месеца, ГФ се препоръчва да се изследва на бм - 1-2 г. Според препоръките на NKF и KDOQI, KDIGO и IFCC(92,94,145,164) от 2012 – 2013 г., ХБЗ се определя, като аномалии на бъбречната структура или функция за период над 3 месеца с последици за здравето. То следва да се класифицира въз основа на тройката (CGA): причина, ГФ и албуминурия. Прогнозата на ХБЗ се определя от причината, категорията на ГФ и категорията на албуминурията. Критериите за хронична бъбречна недостатъчност са албуминурия А2 и $\text{ГФ} < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ с продължителност над 3 месеца. **Ние също установихме известно разминаване между албуминурията и АСР, както и между протеинурията и РСР от една страна и ГФ от друга страна във всички изследвани групи.** Белтъчните показатели (албумин и ОБ в урината, АСР и РСР се променят по-често и по-силно в сравнение с ГФ. Процентът на болните с нормална албуминурия А1 е най-висок при хипертониците (60,1%), следван от диабетиците без хипертония (51,3%) и диабетици с хипертония (47,5%) и най-нисък при бъбречно болните (35%). **Белтъчните маркери са по-подходящи и за мониториране развитието на заболяването.** От друга страна промените в албуминурията са променливи, докато промените в ГФ обикновено са прогресивни. Оценката на ГФ продължава да се смята за най-добрият индекс за нивото на бъбречната филтрация. **Според нас, оптималното откриване на ХБЗ изисква едновременното определяне на ГФ чрез комбинираната формула и на протеинурията чрез албуминурия и АСР, както и ОБ в урината и РСР.** . Получените от това проучване резултати показват, че цистатин С е ендегенен, неинвазивен показател, с висока диагностична чувствителност, който следва да намери място и в нашата страна за оценка на ГФ при диабетици и хипертоници. Скрининг за албуминурия А2 следва да бъде стратегия за диабетици и хипертоници у нас.

ИЗВОДИ

1. Въведени и верифицирани са аналитични методи за определяне на цистатин С в кръвен серум (имунологичен метод РЕТІА), имунотурбидиметричен метод за албумин в урината и турбидиметричен метод с бензетонинов хлорид за общия белтък в урината.

Предлагам Ви следната редакция на т.2

2. Определени са референтни стойности за цистатин С в кръвен серум, албумин и общ белтък в урината, АСR и РСR, ГФ само с креатинин, само с цистатин С и с комбинация от креатинин и цистатин С на референтна група от 153 здрави лица.

3. Албуминурията се отчита съгласно препоръките на НКF в три категории А1, А2 и А3. Използваното досега понятие микроалбуминурия се замества с албуминурия А2, а макроалбуминурията с албуминурия А3, което е по-точно и отговаря на международните изисквания.

4. Албуминурията, определена директно или чрез АСR в средна порция на първа сутрешна урина, е много ранен и високо чувствителен и неинвазивен биомаркер за диагностика на ХБЗ при диабетици и хипертоници.

3. Намалението на ГФ е по-специфичен биомаркер от албуминурията за диагностиката на ХБЗ и е по-малко податлив на промени, но по принцип се позитивира по-късно от албуминурията, при по-тежко засягане на гломерулите.

4. Позитивирането на албуминурията предшества намалението на гломерулната филтрация при всички наши болни (диабет тип 2 със и без хипертония, есенциална хипертония и хронични първични бъбречни заболявания).

5. Двата маркера албуминурия с АСR и ГФ се разминават между 10 и 30% в различните групи болни с диабет, с диабет+хипертония, с есенциална хипертония и с ХПБЗ и това налага едновременното им използване.

6. Комбинираната формула с цистатин С и креатинин за определяне на ГФ дава най-надежни резултати по отношение на диагностична ефективност (специфичност, чувствителност, предиктивна стойност и точност) и тази формула е препоръчително да измести използваната у нас MDRD, каквато е и препоръката на НКF и KDOQI от 2012-2013 г.

9. При диабетици без регистрирана хипертония промените в повечето изследвани показатели са по-рядко и по-слабо изразени в сравнение с болните с диабет тип 2 + хипертония при еднаква възраст и давност на заболяването.

10. Въпреки известни предимства на цистатин С при оценка на ГФ, според нас на този етап е уместно успоредното му използване с креатинина, защото двата биомаркера се допълват.

11. Получените от нас резултати показват, че цистатин С е биомаркер с висока диагностична ефективност, който следва да намери място и в нашата страна за оценка на ГФ при диабетици и хипертоници. Скрининг за албуминурия А2 следва да бъде стратегия за диабетици и хипертоници у нас.

4 ПРИНОСИ

1. За първи път у нас са определени референтни граници при възрастни за цистатин С, АСR, РСR и процент на албумина от ОБ.

2. За първи път у нас е извършена сравнителна оценка за определяне на изчислена ГФ като се прилагат четири формули - MDRD само с креатинин; СКD-EPI само с креатинин; СКD-EPI само с цистатин и СКD-EPI с креатинин и цистатин и са установени референтните граници на ГФ за възрастни.

3. За първи път е установено, че появата на хипертония при болни с регистриран диабет тип 2 води до по-чести и по-тежки промени на протеиновите биомаркери (албумин в урината, АСR, РСR, ОБ и процент на албумина от ОБ), както и на цистатин С и креатинин в серума.

4. Въз основа на резултатите от проучването установихме, че при клинично здрави лица албуминът е около 1/3 от общия белтък в урината и при увреждане на бъбреците той се увеличава пропорционално на прогресията на патологичния процес при диабетици и хипертоници.

5. За първи път у нас регистрираме по-големи интраиндивидуални вариации в албумина и общия белтък в урината в сравнение с АСR и РСR, затова е необходимо едновременното им изследване.

6. За първи път доказахме, че при албуминурия А3, албуминът е основен компонент на ОБ за разлика от клинично здравите лица.

5 ПРЕПОРЪКИ

1. Средна порция на еднократна сутрешна урина следва да замени използването на 24 ч урина при определяне на протеиновите маркери – албумин(албуминурия А1, А2 и А3), АСR, ОБ, РСR и процент на албумина от ОБ

2. При болни с диабет тип 2 и есенциална хипертония, анализът на протеиновите маркери следва да започне максимално рано след регистриране на заболяването, без да се изчакват години.

3. По - често се установяват промени в протеиновите маркери и нормална ГФ, отколкото намалена ГФ и нормални белтъчни показатели. На база на тези данни препоръчваме едновременното им използване за ранно установяване на ХБЗ при диабет и есенциална хипертония

4. Албуминурия А1, А2 и А3 следва да заменят термините нормална албуминурия, микроалбуминурия и макроалбуминурия, каквито са и международните препоръки

6 НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Mihailov, R., B. Pencheva Definition of reference values for cystatin C in healthy donors in Bulgaria. Poster session, P030, XIV-th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation & 7-th Hellenic Congress of Clinical Chemistry, ATHENS, 2008.

2. Михайлов, Р., Б. Пенчева Цистатин С, като маркер за хронична бъбречна недостатъчност. Постерна сесия, D3, Национална конференция по клинична лаборатория с международно участие, Слънчев бряг, 2009.

3. Михайлов, Р., Б. Пенчева Измерване на желатиназа асоциран липоклалин при пациенти с хронична бъбречна недостатъчност. Постерна сесия, D4, Национална конференция по клинична лаборатория с международно участие, Слънчев бряг, 2009.

4. Mihailov, R., B. Pencheva Cystatin C and kidney biopsy in patients with chronic kidney disease. Poster session, PP-040, 17th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, Охрид, Македония, 2009.

5. Михайлов, Р., Б. Пенчева, В. Василев, В. Стоянова Цистатин С - референтни граници, значение за клиничната практика. Мед Преглед, 46, 2010, 52-57.

6. Златева, С. А. Асенова, Р. Михайлов, Б. Пенчева, В. Петкова Референтни граници при определяне на съотношение белтък/креатинин и микроалбумин в урина. Постерна сесия, D3, Национална конференция по клинична лаборатория с международно участие, Златни пясъци, 2011.

7. Михайлов, Р. Цистатин С - нов биомаркер за оценка на бъбречната функция, Мед Маг, 12, N 6, 2013, 14 – 17.

8. Михайлов, Р. Микроалбуминурия и съотношение албумин/креатинин. Мед Маг, 12, N9, 2013, 18 – 21.

9. Mihailov, R. The new Biomarker Cystatin C and Albumiuria. Академично издателство „Проф. Марин Дринов“ – под печат.