МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

Д-р Ива Красимирова Костадинова

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНА ОЦЕНКА НА АКТИВНОСТТА И МОДЕЛ НА ПОВЕДЕНИЕ ПРИ ИгА-ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и

научна степен „*доктор*“

ДОКТОРСКА ПРОГРАМА „НЕФРОЛОГИЯ”

Научен ръководител:

Проф. Мила Любомирова, дм

София, 2024г.

Дисертационният труд се състои от 164 страници и се онагледява със 36 фигури и 41 таблици. Библиографията включва 210 заглавия, от които 24 от последните 5 години.

Проучването е осъществено в Катедра по вътрешни болести на МУ-София.

От 2017 до 2022 година докторантът работи към Клиника по нефрология на УМБАЛ „Александровска“, а от февруари 2022 към настоящем във II вътрешна клиника, отделение по нефрология на УМБАЛ „Св. Анна“.

Докторантът е обсъден, приет и насочен за защита пред научно жури от Катедрен съвет на Катедра вътрешни болести, МУ- София на 18.06.2024г.

Научно жури:

1. Проф. д-р Борис Илиев Богов, дм

2. Проф. д-р Боряна Петрова Делийска, дмн

3. Проф. д-р Емил Павлов Кумчев, дм

4. Доц. д-р Димитър Георгиев Николов, дм

5. Доц. д-р Едуард Емил Тилкиян, дм

Резервни членове:

1. Доц. д-р Васил Венциславов Василев, дм
2. Доц. д-р Велислава Димитрова Димитрова, дм

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 26.09.2024г., от 12 часа в Аулата на УМБАЛ „Св. Анна“, гр. София, ул. „Димитър Моллов“ на открито заседание на научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата и са публикувани на интернет страницата на МУ-София (mu-sofia.bg).

СЪДЪРЖАНИЕ

Абревиатури ..... Error! Bookmark not defined.

1 Въведение 8

2 Цел и задачи 9

2.1 Цел 10

2.2 Основни задачи 10

3 Материали и методи 11

3.1 Изследвани лица и биологичен материал 11

3.1.1 Подбор на пациенти с ИгА нефропатия 11

3.2 Методи за изследване на биомаркери при пациентите с ИгАН и здравите контроли 15

3.2.1 Изследване на Гд-ИгА1, BAFF, APRIL 15

3.2.2 Изследване на имуноглобулин А (ИгА) 18

3.2.3 Изследване на серумен комплемент – С3 фракция 18

3.3 Статистически методи за обработка на получените резултати 19

3.3.1 Дескриптивна статистика 19

3.3.2 Графичен анализи 19

3.3.3 Fisher's exact тест, Fisher-Freeman-Halton exact тест и тест χ^2 19

3.3.4 Непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк 19

3.3.5 Еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) 19

3.3.6 Тест за свързани извадки - Т-критерий на Стюдън 19

3.3.7 Непараметричен тест на Крускал-Уолис 19

3.3.8 Непараметричен тест на Ман-Уитни 19

3.3.9 Множествен бинарен логистичен регресионен анализ 20

4 Резултати 21

4.1 Епидемиологична и клинична характеристика на пациентите с ИгАН 21

4.2 Среден период на проследяване 26

4.3 Патоморфологична характеристика на материала от ПББ сред пациентите с ИгАН 29

4.3.1 Класификацията по Haas 29

4.3.2 Класификацията по OXFORD – MEST-C 31

4.3.3 Имунофлуоресцентно изследване 31

4.4 Оценка на фактори влияещи върху тежестта на заболяването при поставяне на диагнозата 32

4.4.1 Корелационна зависимост между клинико-лабораторните характеристики и хистологичния стадий при поставяне на диагнозата 32

4.4.2 Корелационна зависимост между ехографския образ и степента на ХБЗ по KDIGO при поставяне на диагнозата 40

4.5 Оценка на фактори влияещи върху прогресията на болестта 41

4.5.1 Корелационна зависимост между клинико-лабораторните характеристики и прогресията на болестта 41

4.5.2 Корелационна зависимост между хистологичните промени и прогресията на болестта 43

4.6 Оценка на биомаркери, асоциирани с патогенезата на болестта, тяхната диагностична и прогностична роля 47

4.6.1 Серумни нива на ИгА при пациенти с ИгАН и здрави контроли 47

4.6.2 Серумни нива на Гд-ИгА1 при пациенти с ИгАН и здрави контроли 49

4.6.3 Серумни нива на С3 при пациенти с ИгАН и здрави контроли 51

4.6.4 ИгА/С3 и Гд-ИгА1/ИгА съотношение при пациенти с ИгАН и здрави контроли 52

4.6.5 Серумните биомаркери и прогресия на болестта 54

4.6.6 Серумни нива на BAFF при пациенти с ИгАН и здрави контроли 54

4.6.7 Серумни нива на APRIL при пациенти с ИгАН и здрави контроли 55

4.7 Оценка на ефективността от проведените терапевтични протоколи 56

4.7.1 Лечение с ACEi/ARB 57

4.7.2 Лечение само с кортикостероид 57

4.7.3 Лечение с кортикостероид и ACEi/ARB 58

4.7.4 Лечение с кортикостероид и циклофосфамид 60

4.7.5 Лечение с комбинация с кортикостероид и азатиоприн 61

4.7.6 Ефект от прилаганите терапевтични режими и степента на протеинурия 62

5 Обсъждане 64

6 Изводи 78

7 Приноси 79

8 Препоръки 80

9 Публикации и участия в научни прояви 81

Използвани съкращения

На кирилица

Гд-ИгА	Галактозо-дефицитен имуноглобулин А
ГН	Гломерулонефрит
ГИТ	Гастроинтестинален тракт
ИгА	Имуноглобулин А
ИгАН	Имуноглобулин А нефропатия
ИгГ	Имуноглобулин Г
ИгЕ	Имуноглобулин Е
ИгМ	Имуноглобулин М
ИК	Имунни комплекси
КС	Кортикостероид
МАЛТ	Мукозо-асоциираната лимфоидна тъкан
Микро-РНК	Микро рибонуклеинова киселина
ММФ	Микофенолат мофетил
мИгА	Мономерна форма на имуноглобулин А
ОБЗ	Остро бъбречно заболяване
ОБУ	Остра бъбречна увреда
ОСГС	Огнищно-сегментна гломерулна склероза
ПББ	Пункционна бъбречна биопсия
пИгА	Полимерна форма на имуноглобулин А
РААС	Ренин-ангиотензин-алдостеронова система
СЗО	Световната здравна организация
СК	Система на комплемента
ХБЗ	Хронично бъбречно заболяване

ХБН	Хронична бъбречна недостатъчност
ХХК	Хидроксихлороквин

На латиница

ACEI	Инхибиторите на ангиотензин - конвертиращия ензим
APRIL	Индуциращ пролиферацията лиганд
ARBs	Ангиотензин-рецепторни блокери
ATG	Анти-тимоцитен глобулин
BAFF	В-клетъчен активиращ фактор
BMI	Индекс на телесна маса
CDR	Комплемент определящ регион
DEFA	Дефензин α
ELISA	Ензимно - свързан имуносорбентен анализ
eGFR	Изчисляване на гломерулна филтрация
FDA	Агенция за контрол на храните и лекарствата на САЩ
IL-6	Интерлевкин 6
GWAS	Геномни асоциативни проучвания
TGF-β	Трансформиращ растежен фактор-β
uPCR	Протеин/креатинин съотношение в урина

1 Въведение

Имуноглобулин А нефропатия (ИгАН), или още известна в литературата като болест на Berge, е един от, ако ли не, най-честият първичен гломерулонефрит. Честотата варира в широки граници спрямо географските райони, като най-висока е за Азия. Заболеваемостта обхваща 8-30 пациенти на милион годишно (пмг) за страните в южна Европа (Испания, Италия, Франция), сравнено с повече от 140 пмг в Япония.

Болестта се проявява във всички възрасти, но най-често между второ-трето десетилетие, като характерно е превалиране на мъжки пол в отношение 2:1 до 6:1, и изключително рядко при деца под 10 годишна възраст. В световен мащаб близо 80% от пациентите са на възраст между 16 и 35 години, при провеждането на пункционна бъбречна биопсия (ПББ).

Клинично заболяването може да се прояви с редица симптоми, от безсимптомна микроскопска хематурия до остра бъбречна увреда и бързо влошаване на бъбречната функция.

Въпреки високата честота на заболяването, както и провеждането на множество клинични проучвания, патогенезата остава все още ненапълно установена. Биохимични и генетични проучвания, през последните две десетилетия, установяват повишена продукция на неправилно гликозилирани ИгА1. Тези променени имуноглобулини се характеризират с липсата на галактоза, която нормално се добавя към О-свързаните гликани, намиращи се в шарнирната област на молекулата. Разпознати като чужди, галактозо-дефицитни ИгА1 се свързват с образуваните към тях автоантитела, водещо до изграждането на циркулиращи имунни комплекси, отлагащи се в бъбречния гломерул. Резултатът е „дразнене“ на мезангиалните клетки, повишена продукция на цитокини, хемокини, както и активиране на системата на комплемента, водещо до бъбречна увреда.

Новите разкрития в патогенезата на заболяването стимулират изследването на много потенциални биомаркери, имащи за цел неинвазивната диагностика на болестта, като насочват вниманието към нови таргетни терапии с изключително значение и интерес през последните години. За да се постави диагнозата, все още златен стандарт е провеждането на пункционна бъбречна биопсия (ПББ), инвазивен метод, с последващо задължително имунофлуоресцентно изследване на материала.

Въпреки бавната прогресия на болестта, както и разглеждането на това заболяване в миналото като „доброкачествено“, се установява, че при 30-40% от болните с ИгАН се поставя диагнозата хронично бъбречно заболяване – терминален стадий, изискващо започване на хрониодиализано лечение, около 10 години след провеждането на ПББ.

На този етап не съществува специфична терапия, като основна цел е добрият контрол на артериалното налягане, провеждане на поддържащо лечение с антипротеинурични медикаменти.

Настоящият дисертационен труд демонстрира подробен и всеобхватен ретроспективен анализ на честотата, клиничните прояви, патоморфологичните характеристики на болестта, както и модели на терапевтично поведение при пациентите с ИгАН, диагностицирани в един нефрологичен център в България. За първи път, сред популация от български пациенти, се обследват нови потенциални биомаркери за активност на заболяването, с критична оценка за техния потенциал да заменят провеждания досега инвазивен метод на диагностика – ПББ. Новите таргетни терапии, проучващи се през последните години, а някои от тях вече и налагащи се в клиничната практика, показва изключителната актуалност на проблема, както и значимостта на познаването на хода на болестта и оценка на активността

2 Цел и задачи

2.1 Цел

Да се оценят клинико-лабораторни прояви и морфологични белези характеризиращи активността на ИгА нефропатия, както и определяне на модели на терапевтично поведение.

2.2 Основни задачи

1. Да се проведе епидемиологична характеристика на пациентите с ИгА нефропатия

- честота на заболяването, сред проведените ПББ за посочения период

- средна възраст на пациентите при поставянето на диагнозата

- среден период между появата на първите симптоми на заболяването и поставянето на диагнозата чрез ПББ

2. Да се определят основните клинико-лабораторни и патоморфологични признаци на ИгАН и тяхната честота

3. Да се оцени ролята на придружаващите заболявания и провокиращи фактори върху прогресията на болестта

- честота на гърлени инфекции – рисков фактори за рецидив на болестта

- честота на рецидивиращи уроинфекции – рисков фактор за бъбречна увреда

- честота на вторичната артериална хипертония - рисков фактор за бъбречна увреда

- хронични чернодробни заболявания – рисков фактор за рецидив на болестта

- тонзилектомия, асоциацията с редукция честотата на рецидиви на болестта

-оценка на рисковите фактори: анемия, хиперхолестеролемия, хиперлипидемия, хиперурикемия върху прогресията на болестта

4. Да се проучат биомаркери, асоциирани с патогенезата на болестта, както и тяхната роля като потенциални имунологични критерии за активност на заболяването и неговата прогресия

5. Анализ на хистоморфологичния резултат на проведените ПББ за посочения период

- честота на различните стадий на ИгАН по Haas

- прекласифициране на хистологичния резултат по MEST-C

- съпоставяне на двете класификации (Haas и Oxford – MEST-C), оценка на прогностичната им стойности

- търсенето на корелация между хистоморфологичния резултат и степента на бъбречна увреда при поставянето на диагнозата

6. Да се оцени ефективността на проведения терапевтичен протокол, чрез:

- оценка на бъбречната функция през годините

- степен на протеинурия през годините

- честота на рецидив през годините

7. Да се проследи еволюцията на ИгАН за период от 1,3,5,7 години, след поставяне на диагнозата.

3 Материали и методи

Научното изследване е проведено на два етапа. Първи етап - ретроспективно кохортно проучване, проведено в Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“ за периода 2010-2020г., или 10 годишен период. Втори етап – проспективно кохортно проучване обхващащо всички новодиагностицирани пациенти с ИгА нефропатия в Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“, за период от 4 години. Протоколът на настоящото проучване е одобрен от етичната комисия на Медицински университет – София, №10, 23.01.2019г.

3.1 Изследвани лица и биологичен материал

3.1.1 Подбор на пациенти с ИгА нефропатия

Подборът и клиничната оценка на пациентите, включени в дисертационния труд, са извършени в Клиника по нефрология на УМБАЛ „Александровска“ – София. При всички болни диагнозата е поставена от екипа на клиниката, след което са проследявани периодично в медицинското звено. Всички пациентски досиета към Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“, за периода януари 2010 – декември 2020, при които е проведена ПББ, са обстойно проучени. Медицинската документация на пациентите с патоморфомологичен резултат – ИгА нефропатия са включени в това проучване. Това са 125 пациенти с диагнозата ИгА нефропатия или 16,3% от всички

проведени биопсии (общ брой 765). Събрани и обобщени са пълните анамнестични, клинични и лабораторни данни на пациентите, като на 50 пациенти с ИгАН и на 30 здрави контроли са проведени допълнителни имунологични изследвания включващи: Гд-ИгА1, ИгА, С3, Гд-ИгА1/ИгА, ИгА/С3, BAFF, APRIL. Селектирането на подходящите пациенти, включени в проведения анализ, е базирано на apriori зададени включващи и изключващи критерии. В дисертационния труд са включени само пациентите с биопсично доказан ИгАН, при които е проведена ПББ в УМБАЛ „Александровска“. Всички пациенти с недостатъчен материал от ПББ, брой гломерули под 10, както и всички пациенти с вторична ИгА или друга нефропатия, са изключени от анализа.

3.1.1.1 Включващи и изключващи критерии

∨ Критерии за включване на пациенти с ИгА нефропатия

- Мъже и жени на възраст ≥ 18 години;
  - Поставена диагноза ИгАН, проведена ПББ в Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“ – София, с достатъчен патоморфологичен материал. Светлинно-микроскопско и имунофлуоресцентно изследване е проведено от доц. Т.Тодоров, проф. В. Минкова;
- Лица, желаещи и способни да подпишат информирано съгласие за участие в научното изследване, включително за вземане на биологичен материал – периферна венозна кръв;

⊗ Критерии за изключване

- Диагностицирана вторична ИгАН или друго гломерулно заболяване;
- Наличието на хронично чернодробно заболяване – доказан хроничен вирусен хепатит;
- Наличие на възпалително чревно заболяване: Крон, ХУК и др.;
- Недостатъчен патоморфологичен материал от ПББ, подлагащо на съмнение диагнозата ИгАН
- Липсата на имунофлуоресцентно изследване от проведената ПББ

3.1.1.2 Демографски и клинико-лабораторни данни

Проведе се ретроспективен анализ на всички медицински досиета в клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“ за посочения период от 2010 до 2020 година. Събрани са данни за демографските и клиничните характеристики на заболяването при

всеки пациент към момента на поставянето на диагнозата, включително подробна анамнеза, давност на оплакванията, физикално изследване, лабораторни данни, както и времето до поставяне на диагнозата. Представена е и подробна информация относно регулярното проследяване на пациентите в клиниката през годините. Медицинските досиета са подробно проучени както за клиничната изява на болестта (възраст, давност на оплакванията, придружаващи заболявания, гърлени инфекции, епизод на макроскопска хематурия, клинични симптоми), така и за проведения панел от лабораторни изследвания, извършен на пациентите в клиниката. Кръвни изследвания включват изследване на: хемоглобин, серумен креатинин, урея, холестерол, триглицериди, общ белтък, албумин, пикочна киселина, хепатитни маркери – HbsAg, anti HCV, анализ на урина (изследване на уринен седимент, изследване на урина с тест лента (dipstick test), 24 часа/ протеинурия). Проведен е подробен анализ на хистопатологичния резултат от ПББ (светлинна микроскопия, имунофлуоресцентно изследване), период на проследяване и не на последно място терапевтичния режим.

Хипертония се определи като систолично кръвно налягане ≥140mm Hg и/или диастолично кръвно налягане ≥90mm Hg или лечение с антихипертензивни медикаменти. Анемия се определи чрез специфични за пола критерии за серумна концентрация на хемоглобин: <120g/l при мъже и <110g/l при жени. Хиперурикемия се определи от специфични за пола критерии за серумна нива на пикочна киселина >420μmol/l при мъже и >360μmol/l при жени. Хиперхолестеролемия се определи като ниво на общ холестерол ≥5,2mmol/l, а хипертриглицеридемия като ниво на триглицериди ≥1,7mmol/l.

Креатининовият клирънс е калкулиран на базата на формулата CKD-EPI GFR (The Chronic kidney disease Epidemiology Collaboration for glomerular filtration rate). Пациентите са разделени на две групи: „прогресори“ и „непрогресори“. Като в групата на „прогресори“ са включени всички пациенти, при които е установено влошаване в категорията на ХБЗ според класификацията на KDIGO, т.е намаляване на еГФР спрямо стойността установена при провеждането на ПББ, или тези пациенти, при които се наблюдава удвояване на стойностите на сер. креатинин, спрямо базовата, отново установена при поставянето на диагнозата чрез ПББ. Като „непрогресори“ са категоризирани всички пациенти със стабилна бъбречна функция, без влошаване в стадия на ХБЗ по класификацията на KDIGO или тези, при които се установява

подобрение в стойността на ГФР или серумния креатинин, спрямо базовите резултати, при провеждането ПББ.

В допълнение на 50 новодиагностицирани пациенти с ИгАН и 30 здрави контроли, са извършени и имунологични изследвания за определяне на серумната концентрация на биомаркерите: Гд-ИгА1, ИгА, С3, Гд-ИгА1/ИгА, ИгА/С3, BAFF, APRIL. Пробите са изработени със съдействието на Клиника по имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София, д-р Г. Василев, д-р Е. Куртева, проф. Д. Кюркчиев.

При всички пациенти резултатът от ПББ е анализиран и класифициран по Haas. Поради заложения златен стандарт в световен мащаб от 2009 година, всички бъбречни биопсии са преразгледани и прекласифицирани и по „OXFORD MEST-C score“ системата. Това даде възможност да се проведе подробен анализ между двете класификации, както и да се определят техните предимства и недостатъци.

Всички включени в това проучване пациенти са проследени за среден период от 69 ± 29,19 месеца.

3.1.1.3 Информирано съгласие и вземане на биологичен материал от изследваните пациенти с ИгАН и здрави контроли

Всички участници са запознати с целите на изследването и доброволно са подписали информирано съгласие според Декларацията на Хелзинки. Проучването е одобрено от Комисия по етика на научните изследвания към Медицински университет – София. Личните данни и резултатите от изследването са съхранявани, обработвани и представяни в съответствие със Закона за защита на личните данни, в сила от 01.01.2002г., изм. ДВ. Бр. 57 от 13 юли 2007г. и с Регламент (ЕС) 2016/679 на Европейския парламент и на Съвета, от 27 април 2016 година, относно защита на физическите лица във връзка с обработването на личните данни и относно свободното движение на такива данни, като е спазен действащия понастоящем Кодекс на професионалната етика – Раздел IV; Лекарска тайна; чл. 51 и чл.55.

С цел изследване на диагностичния и прогностичния потенциал на посочените биомаркери: Гд-ИгА1, ИгА, С3, Гд-ИгА1/ИгА, ИгА/С3, BAFF, APRIL, е събран биологичен материал – периферна венозна кръв - кръвен серум. След рутинна венепункция е взета периферна венозна кръв с вакутейнер за серум (BD Vacutainer®, CATREF 367955, 5ml). Серумите са отделени съобразно стандартната оперативна процедура в Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“ – София, описани и

съхранявани на t - 80^0C, според изискванията за добра клинична лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове. Кръвните проби на всички лица са изследвани в Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София.

3.2 Методи за изследване на биомаркери при пациентите с ИгАН и здравите контроли

3.2.1 Изследване на Гд-ИгА1, BAFF, APRIL

С цел да се определи серумната концентрация на Гд-ИгА1, BAFF, APRIL се проведе изследване по имуноензимен метод Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA).

- Материал за обработка: серум
- Необходими реактиви и консумативи: кит. Наборът се съхранява при температура от 2 до 8^O и е стабилен до изтичане срока на годност
- Необходима апаратура: ELISA reader, Microplate Photometer MPP-96 (Biosan, USA).
- Принцип на метода

  Използваните в настоящия дисертационен труд китове са твърдофазови ELISA за in vitro количествено определяне на автоантитела в биологични материали. При този метод гнездата на съответната микротитърна плака са натоварени с антигени, носители на епитопи, разпознавани от паратопите на анти-Gd-IgA1 и съответно анти-BAFF, анти-APRIL автоантитела. След добавянето на изследваните проби, съответните автоантитела се свързват към фиксираните върху гнездата на плаките антигени. След това се добавя биотинилирано антитяло, което също се свързва специфично с FC фрагмента на антителата. Като детекционна система се използва конюгат на horse-radish peroxidase (HRP) със стрептавидин, който се свързва с биотина и след добавянето на субстрата тетраметилбензидин (TMB) протича ензимна реакция с образуването на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира с H_2SO4, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е в зависимост от количеството антиген в биологичната проба. Построява се крива според калибраторите на всеки кит и по нея се определя количеството на търсения фактор в тестваните проби.

- Изпълнените на метода

  Изследваните серуми, разредени 1:101, бяха накапани заедно с предоставените в кита калибратори (от А до Е с концентрации съответно 15.625,), две положителни и една отрицателна контрола. Оптичната плътност беше отчита при дължина на вълната 450/630nm на ELISA reader (Microplate Photometer MPP-96, Biosan, USA).
- Вътрешен качествен контрол, калибрация и интерпретация на резултатите

  Тестът бе приет за валиден тогава, когато бяха изпълнение следните критерии:

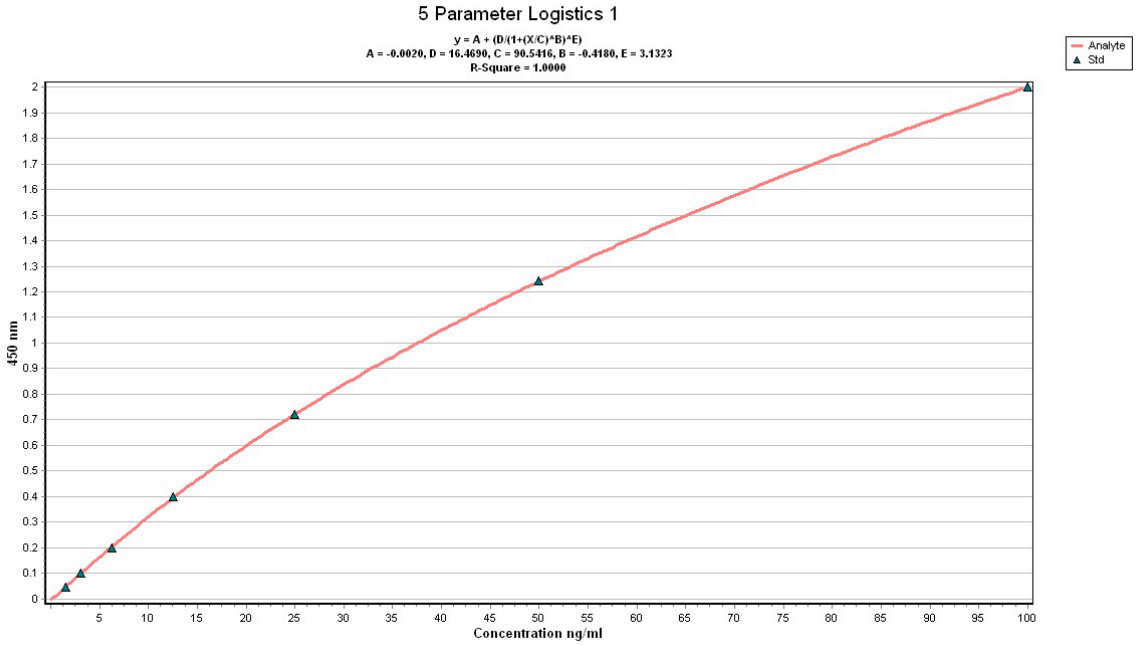
  -абсорбция (OD) на високоположителната контрола (А) трябва да е много по-висока от нискоположителната контрола, а тя на свой ред да е по-висока от отрицателната контрола.

  -OD на калибратора А (15.625 U/ml)>1.0

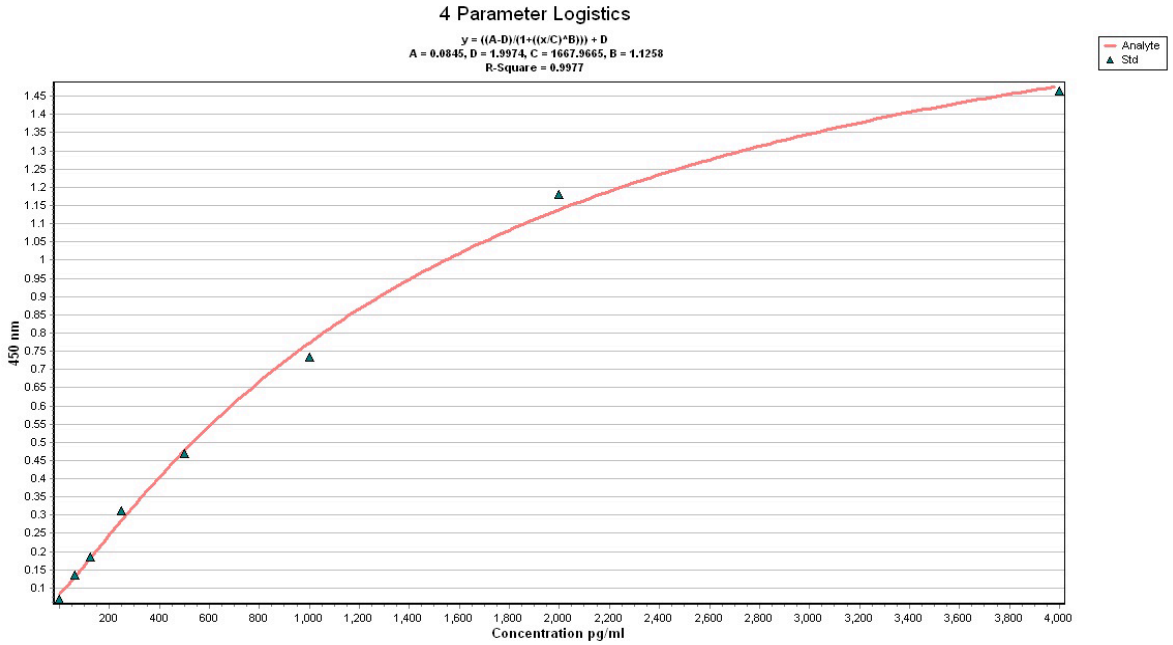
  -OD на отрицателната контролна ≤ 0.2

  -OD на нискоположителната контрола трябва да е 2 пъти повече от OD на (-) контролна или ≥0.25
- Изчисление

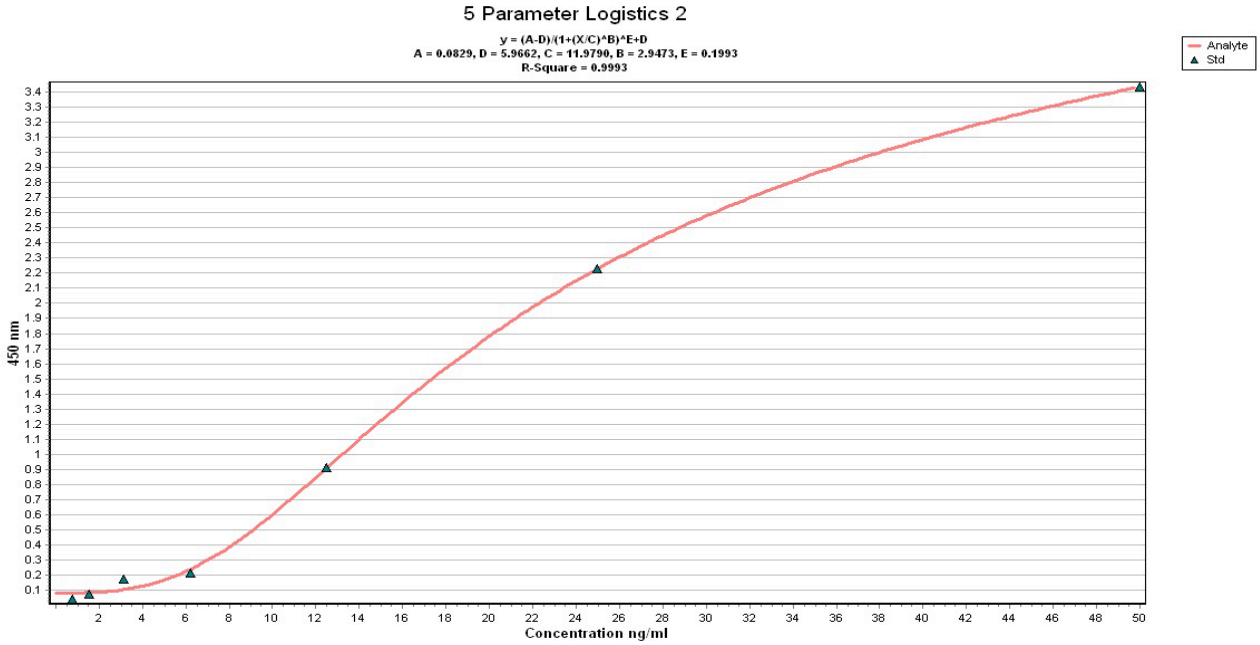
  Индивидуалните стойности на антителата бяха изчислени след построяването на стандартна крива с предоставените в кита калибратори. Отчетените резултати бяха анализирани с Mean% CV функция в програмата за биостатистическа обработка GraphPadPrism 6. За построяването на стандартната крива използвахме четирипараметричен логистичен модел, съгласно указанията на производителя. В допълнение, той бе предпочетен като най-подходящ ($p < 0.05$), спрямо другите математически методи, тъй като имаше най-висок коефициент на корелация (R^2 = 1,000) (Фигура 1, Фигура 2, Фигура 3). За серумите с OD, по-малка от най-малкия стандарт, без позволена екстраполация, чрез използването на построеното регресионно уравнение, а серумите с OD, по-високо от най-големия калибратор, са разредени и повторна анализирани.
- Тълкуване на референтните интервали
- Граница на откриване 1UI/ml
- Диагностична стойност на теста: специфичност (95% CI, 96-99%)



Фигура 1 Стандартна крива, изобразяваща зависимостта между абсорбцията (OD) и концентрацията на антителата срещу Гд-ИгА1 в използваните калибратори. Зависимостта следва логистично разпределение. Приложено е регресионно уравнение с четири параметъра, R2=1,000, p=0,001



Фигура 2 Стандартна крива, изобразяваща зависимостта между абсорбцията (OD) и концентрацията на антителата срещу BAFF в използваните калибратори. Зависимостта следва логистично разпределение. Приложено е регресионно уравнение с четири параметъра, R2=0,9977, p=0,001



Фигура 3 Стандартна крива, изобразяваща зависимостта между абсорбцията (OD) и концентрацията на антителата срещу APRIL в използваните калибратори. Зависимостта следва логистично разпределение. Приложено е регресионно уравнение с четири параметъра, R2=0,9993, p=0,001

3.2.2 Изследване на имуноглобулин А (ИгА)

С цел определяне серумната концентрация на ИгА се проведе изследване по ELISA

- Материал за обработка: серум

3.2.3 Изследване на серумен комплемент – С3 фракция

- Материал за обработка: серум

3.3 Статистически методи за обработка на получените резултати

Необходими консумативи: Програма за биостатистическа обработка на данни: IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0 и Mac, Version 29.0 (Armonk, USA); MedCalc Version 19.6.3; Excel, Office 2023; GraphPad Prism 9 for Mac (GraphPad Software, LLC).

3.3.1 Дескриптивна статистика

Използвахме методите на дескриптивната статистика за описание на демографската и клиничната характеристика на пациентите, както и за представяне на данните от изследваните имунологични параметри с показалите на централната тенденция.

3.3.2 Графичен анализи

За визуализация на получените резултати

3.3.3 Fisher's exact тест, Fisher-Freeman-Halton exact тест и тест χ^2

За проверка на хипотези за наличие на зависимост между категориините променливи

3.3.4 Непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк

Извършихме проверка на нормалност на разпределението на променливите посредством теста на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и Шапиро-Уилк (Shapiro-Wilk). Типът разпределение определени дали да бъдат използвани параметрични или непараметрични тестове за сравнение на извадките.

3.3.5 Еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA)

За проверка на хипотези за различие между средните аритметични на повече от две независими извадки.

3.3.6 Тест за свързани извадки - Т-критерий на Стюдън

За сравняване на средните аритметични на две независими извадки изпозлвацхме тест за свързани извадки – Т-тест на Стюдън (Student)

3.3.7 Непараметричен тест на Крускал-Уолис

За проверка на хипотези за различие между средните аритметични на повече от две независими извадки.

3.3.8 Непараметричен тест на Ман-Уитни

За проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

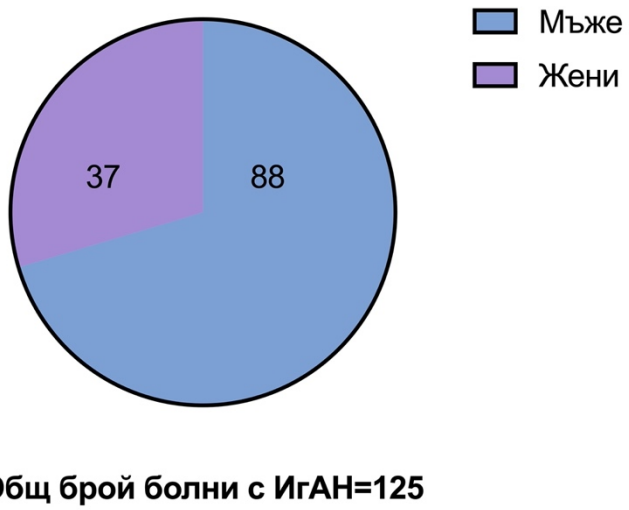
3.3.9 Множествен бинарен логистичен регресионен анализ

За установяване на факторите за изследваното събитие и количествена оценка на тяхното влияние.

4 Резултати

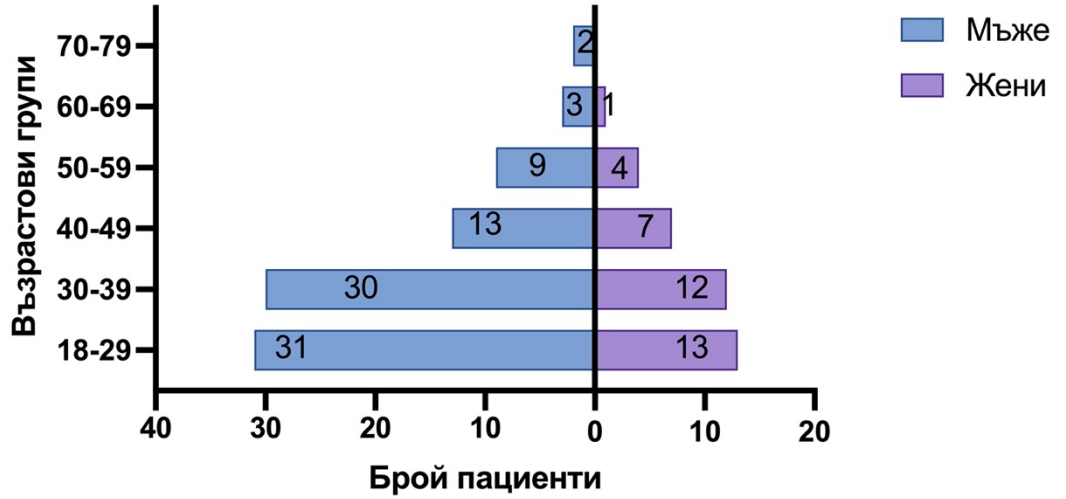
4.1 Епидемиологична и клинична характеристика на пациентите с ИгАН

За периода януари 2010 до декември 2020 година са проведени 765 бъбречни биопсии, като от тях 125 (16,3%) са с хистологичен резултат ИгА нефропатия. Това са 88 мъже и 37 жени, съотношение 2,4:1, Фигура 4.



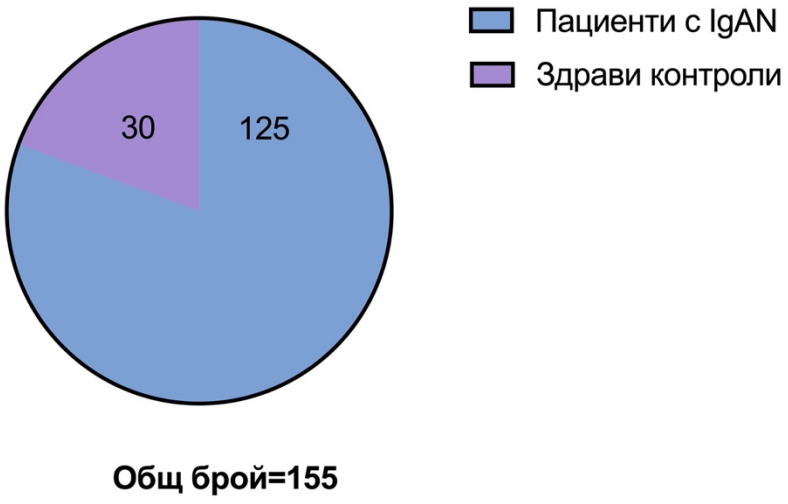
Фигура 4 Кръгова диаграма показваща съотношение мъже: жени при пациентите с ИгА нефропатия.

Възрастта на пациентите при поставяне на диагнозата е между 18 и 73 години, средна възраст 35,94±11,91. Фигура 5 показва разпределението на пациентите по възраст и пол, като се вижда, че при пациентите от мъжки пол с най-голяма численост (31) са от възрастовата група 18-29 години, следвани от 30-39 с 30, а най-малко (2) са във възрастовия диапазон 70-73 години. При пациентите от женски пол отново най-голяма е числеността (13) от възрастова група 18-29 години, следвани от 30-39 с 12, а най-малко (0) – 70-73 години. И сред двата пола най-висока е честотата на пациентите в третата и четвъртата декада.

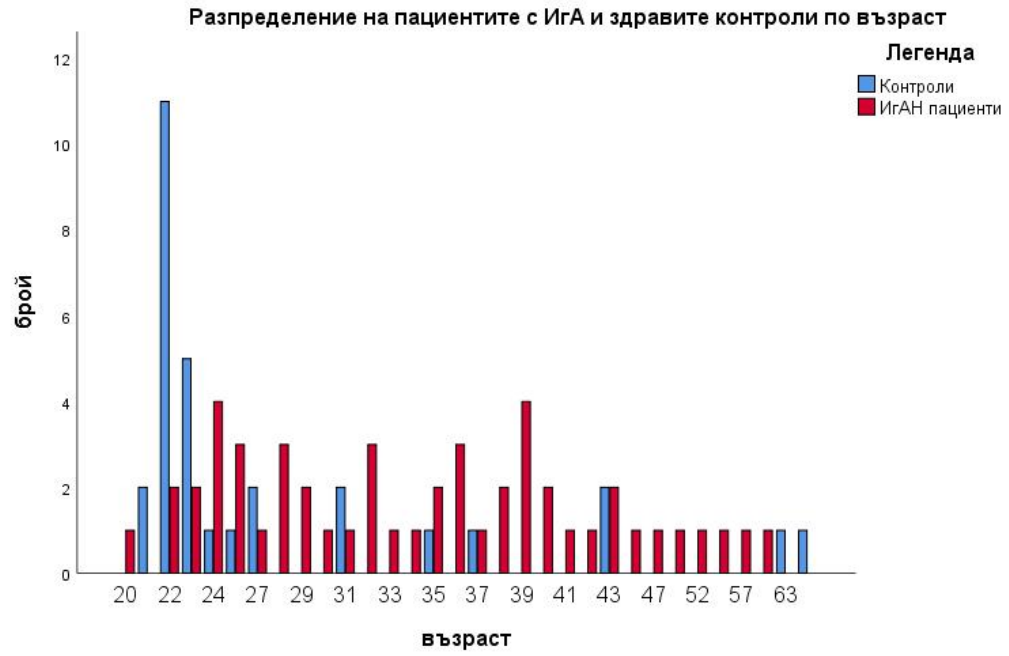


Фигура 5 Популационна пирамида показваща разпределение на пациентите с ИгА нефропатия по пол и възрастови групи.

Всички пациенти с вторична ИгА нефропатия са изключени от проведеното проучване. Това са общо 17 болни, от които 10 с пурпура на Henoch-Schönlein, 2 с доказано чернодробно заболяване – вирусен хепатит, както и 5 пациенти с възпалителни заболявания на червата – Крон (2) и улцерозен колит (3). В проучването са включени и 30 здрави контроли на средна възраст 28,33±11,38. Фигура 6 показва съотношението между пациентите с ИгАН и здравите контроли, а Фигура 7 разпределението по възраст между двете групи .



Фигура 6 Кръгова диаграма показваща честотно разпределение на изследвания контингент по основни групи.

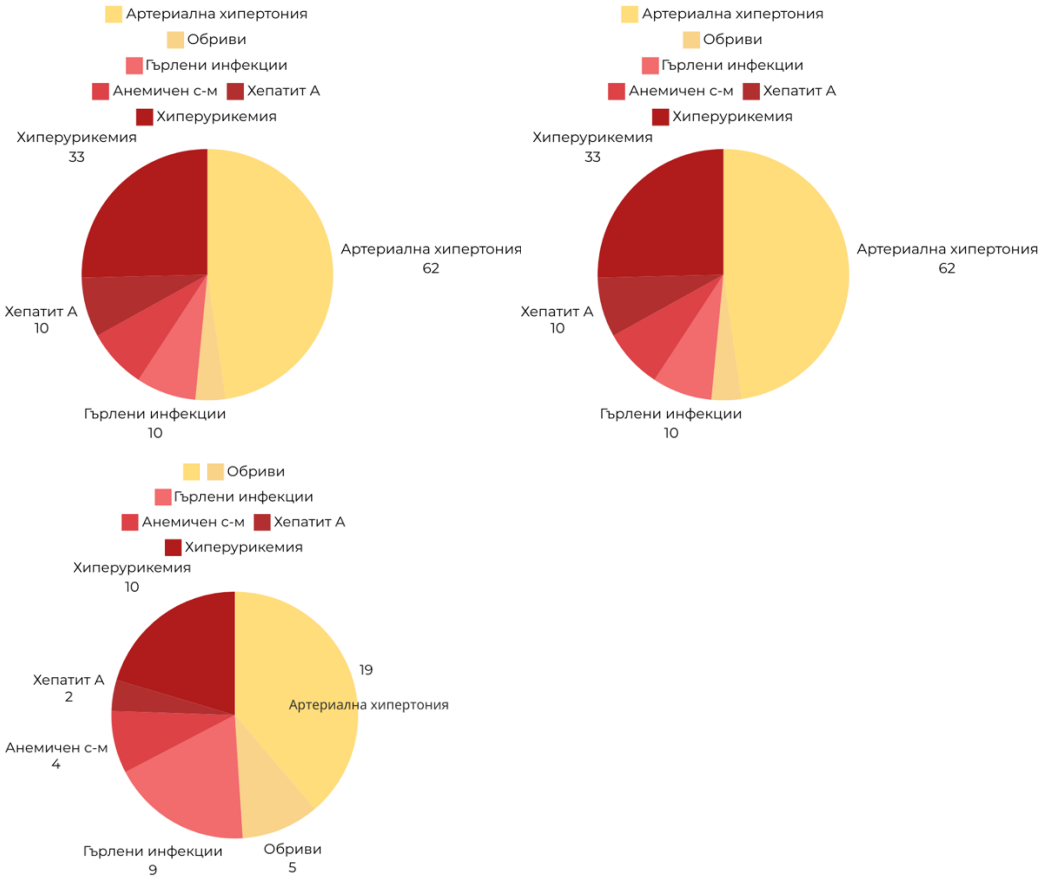


Фигура 7 Разпределение по възраст между двете изследвани групи – пациенти с ИгА нефропатия и здрави контроли.

От 125 пациенти с ИгАН 81 (64,8%) са с анамнеза за артериална хипертония, или е установена такава при първа хоспитализация в клиниката. При 37 (29,6%) от болните има данни за чести гърлени инфекции в миналото. Таблица 4-1 показва обобщени данни за придружаващите заболявания при пациентите с ИгАН, при поставяне на диагнозата, данните са представени и чрез кръгова диаграма, Фигура 8.

Таблица 4-1 Обобщени данни за придружаващи заболявания при пациенти с биопсично доказан ИгАН, при първа хоспитализация в клиниката

		АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ		ТОНЗИЛЕКТОМИЯ		ОБРИВ		ЧЕСТИ ГЪРЛЕНИ ИНФЕКЦИИ		АНЕМИЧЕН СИНДРОМ		ХЕПАТИТ А		ХИПЕРУРИКЕМИЯ	
ПОЛ		Не	Да	Не	Да	Не	Да	Не	Да	Не	Да	Не	Да	Не	Да
	мъж	26	62	82	6	83	5	60	28	76	12	75	13	55	33
	жена	18	19	34	3	32	5	28	9	33	4	35	2	27	10



Фигура 8 Кръгова диаграма представяща придружаващите заболявания/състояние сред пациентите с ИгАН, при поставяне на диагнозата.

При всички пациенти с ИгАН са изследвани следните параметри: хемоглобин, холестерол, триглицериди, пикочна киселина, общ белтък, албумин, анализ на уринен седимент, протеинурия, серумен креатинин, изчислена скорост на гломерулна филтрация по формулата CKD-EPI, на базата на която пациентите се разпределиха и по стадий на ХБЗ по KDIGO. Клиничните характеристики на пациентите са обобщени в Таблица 4-2.

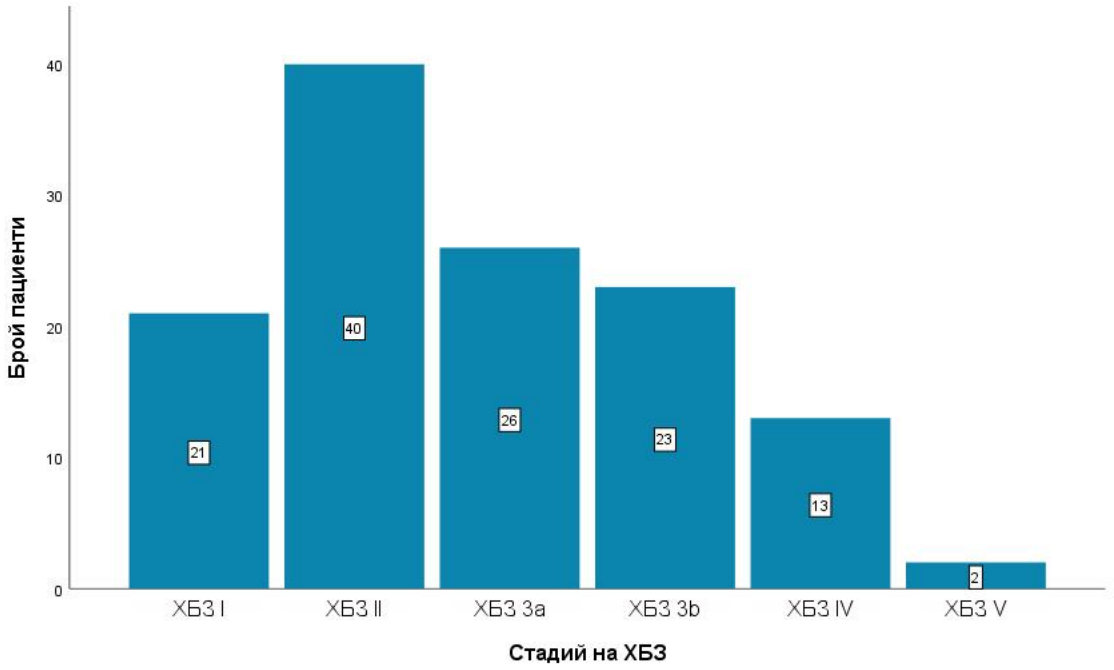
Таблица 4-2 Клинични характеристики на пациентите с ИгАН

	Общ брой пациенти (n=125)
Възраст (години) (Mean±SD) (Range)	35,94 ± 11,91
Пол (М: Ж) (n)	88:37
Hb (g/l) (Mean±SD)	141,37 ± 19,49

Холестерол (mmol/l) (Mean±SD)	5,17 ± 1,45
Триглицериди (mmol/) (Mean±SD)	1,43 ± 0,78
Пикочна киселина (µmol/l) (Mean±SD)	373,7 ± 112,91
Общ белтък (g/l) (Mean±SD)	69,58 ± 6,69
Албумин (g/l) (Mean±SD)	42,03 ± 5,49
Хематурия (n)	
+	62
++	12
+++	46
Макроскопска хематурия (епизод)	50
Протеинурия (g/day) (Mean±SD)	1,34 ± 1,16
Сер. креатинин (µmol/l) (Mean±SD)	125,71 ± 67,83
eGFR (ml/min/1.73 m^2) (Mean±SD)	61,78 ± 27,72
ХБЗ стадий по KDIGO	
1	21
2	40
3a	26
3b	23
4	13
5	2
Давност на оплакванията	24,22 ± 32,9
Период на проследяване	69,60 ± 22,19

От таблицата се вижда, че 50 (40%) от пациентите са с анамнеза за поне един епизод на макроскопска хематурия. При 120 (96%) се установява положителна уринна проба от

тест лента за кръв. Средната стойности на изчислената 24часа/протеинурия е 1,34±1,16 г/24часа. Средната изчислена изходна скорост на гломерулна филтрация (еГФР), изчислена с помощта на формулата CKD-EPI, е 61,78 ± 27,72 ml/min/1,73 m2, а средният диапазон на серумния креатинин при поставяне на диагнозата е 126±67.83 µmol/l. Сред пациентите 64 (51,2%) са имали eGFR под 60 ml/min, което показва ХБЗ стадий 3 или по-напреднал, според класификацията на KDIGO. Разпределението на пациентите по стадий на ХБЗ, при поставяне на диагнозата ИгАН, е показано на Фигура 9.



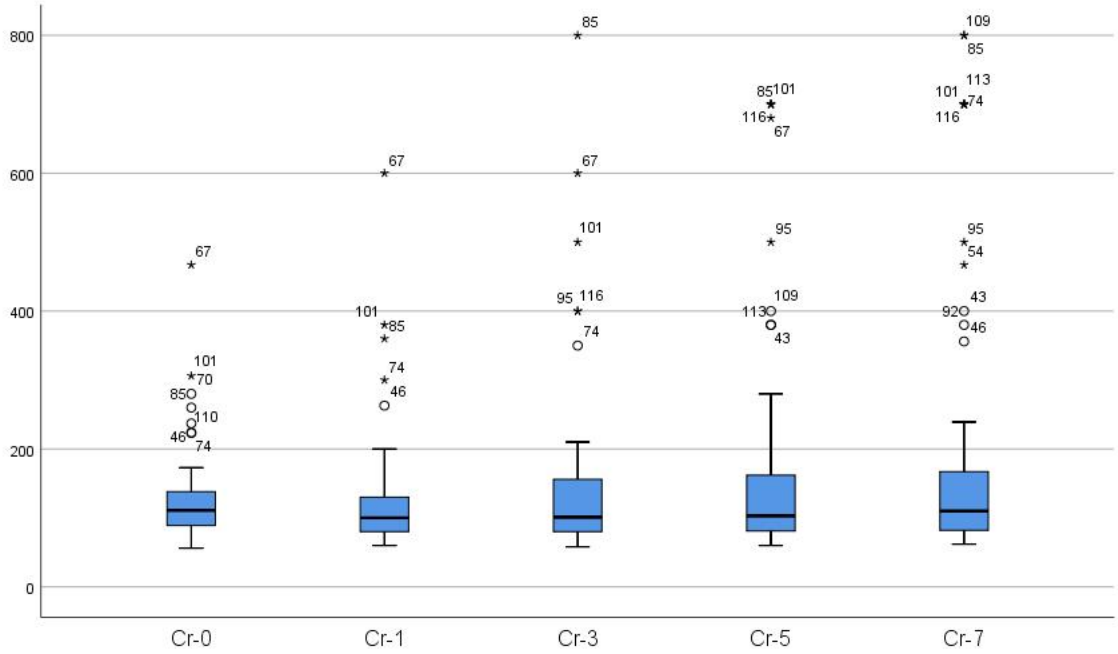
Фигура 9 Разпределение на пациентите с ИгАН според стадия на ХБЗ по KDIGO, при поставяне на диагнозата

Голямо значение и внимание трябва да се обърне на големия брой болни с еГФР под 60мл/мин, повече от половината болни. Това са 26 с ХБЗ IIIа стадий по KDIGO, 23 с ХБЗ IIIб стадий, 13 с ХБЗ IV стадий и 2 с ХБЗ V стадий. Това може да се дължи на продължителния период от първите симптоми на болестта до времето на провеждане на пункционна бъбречната биопсия, което е приблизително 24,22 ± 32,9 месеца, както и на липсата на скринингова програма в България.

4.2 Среден период на проследяване

Пациентите са проследявани регулярно, според протокола на клиниката, на 1, 3, 5, 7 година от провеждането на ПББ. Средният период на проследяване е 69,60 ± 22,19

месеца, като при всички пациенти е проведен панел от изследвания при всеки контролен преглед, включващ: хемоглобин, серумен креатинин, общ белтък, албумин, изследване на уринен седимент, стерилна урина, 24часа/ протеинурия. Фигура 10 показва средните стойности на серумния креатинин при проследяваните пациенти през годините, при поставяне на диагнозата 126,71 ± 67,83 μmol/l, на седмата година 189 ± 81 μmol/l.



Фигура 10 Бокс-плот диаграма със средни стойности на серумен креатинин при поставяне на диагнозата - Cr-0, на първа - Cr-1, трета - Cr-3, пета Cr-5 и седма година- Cr-7 от проследяване на пациентите с ИгАН

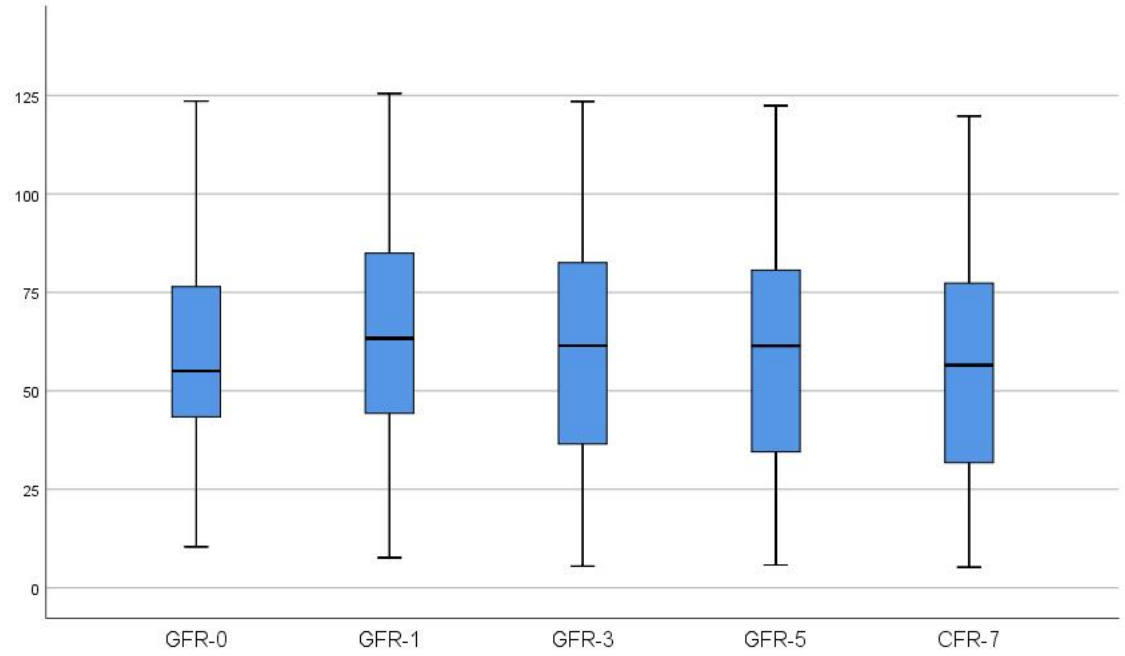
Данните сочат влошаване на бъбречната функция на седмата година, с покачване на средните стойности на серумния креатинин до 189,81μmol/l. В Таблица 4-3 са отразени и подробни данни на броя болни, съответната година на проследяване, както и средна стойност на серумен креатинин.

Таблица 4-3 Таблица със средните стойности на серумен креатинин при поставяне на диагнозата - CR-0, на първа - CR-1, трета - CR-3, пета CR-5 и седма година- CR-7 от проследяване на пациентите с ИгАН

	БРОЙ ПАЦИЕНТИ N	**МИНИМУМ /MINIMUM/**	**МАКСИМУМ /MAXIMUM/**	**СРЕДНА СТОЙНОСТ /MEAN/**	**SD**
CR - 0	125	56	467	126,71	67,83
CR – 1	118	55	798	136,63	108,95

CR - 3	117	56	800	157,03	144,43
CR - 5	94	60	780	172,96	166,31
CR - 7	74	62	800	189,81	196,58

За да се оцени по-коректно и по-точно бъбречната функция, на Фигура 11, Таблица 4-4 са представени данните и от средната изчислена еГФР през годините на проследяване (изчислена по формулата CKD-EPI).



Фигура 11 Бокс-плот диаграма илюстрираща данните от еГФР на пациентите с ИгАН при поставяне на диагнозата - GFR-0, през първата GFR-1, третата GFR-3, петата GFR-5 и седмата GFR-7 от проследяване

Таблица 4-4 еГФР на пациентите с ИгАН при поставяне на диагнозата GFR-0, през първата - GFR-1, третата - GFR-3, петата - GFR-5, седмата - GFR-7

	Брой пациенти N	*Минимум /Minimum/*	*Максимум /Maximum/*	*Средна стойност /Mean/*	*Стандартно отклонение /SD/*
GFR-0	125	10,4	123,7	61,78	27,7
GFR-1	118	5,6	125,5	62,6	28,6
GFR-3	117	5,4	123,44	59,9	30,7

GFR-5	94	5,3	122,4	55,7	29,5
GFR-7	74	5,2	119,7	54,7	29,6

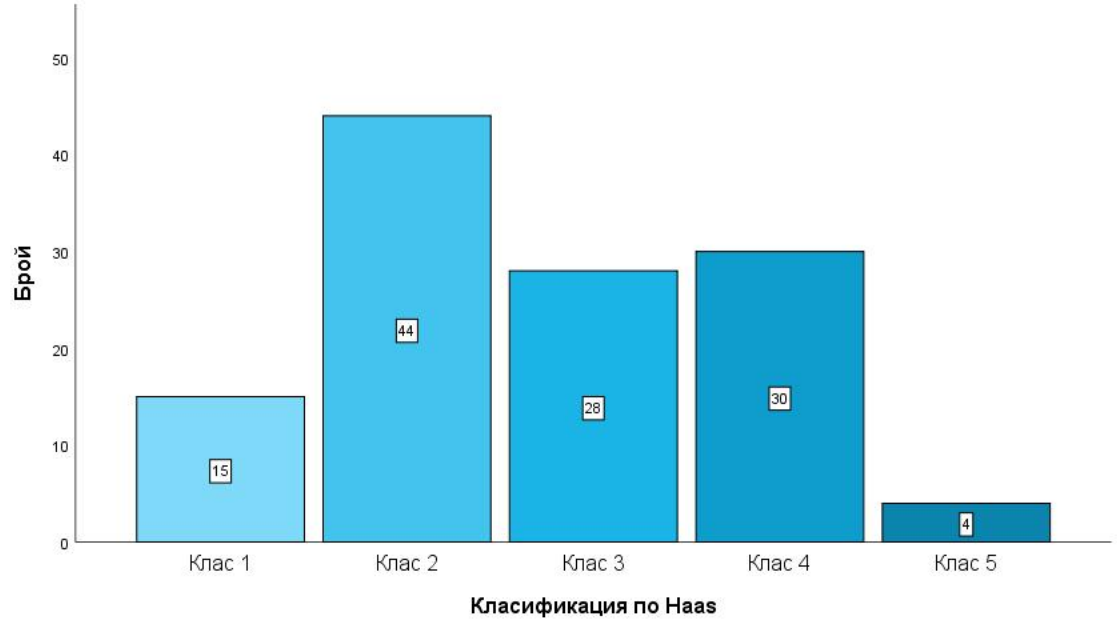
Данните показват влошаване на бъбречната функция, средна стойност на еГФР при поставяне на диагноза от 61,78 до 54,7 на еГФР през седмата година, напредване на стадия на ХБЗ от II по KDIGO до IIIa. Трябва да се отбележи, че в посочената таблица са включени само пациентите, които са продължили да се проследяват до 7 година, това са общо 74 пациенти. Останалите 51 не са добавени поради различни причини: напредване на ХБЗ до терминален стадий 23 (18,4), прекъснато проследяване от клиниката по собствено желание (12) или настъпването на фатален изход поради причина, несвързана с бъбречното заболяване (16).

4.3 Патоморфологична характеристика на материала от ПББ сред пациентите с ИгАН

За да се определят патоморфологичните промени, установени в материала от ПББ, всички бъбречни биопсии са класифицирани по двете най-разпространени патоморфологични класификации за ИгАН: класификацията по Haas, както и златния стандарт за анализ на ИгАН от 2009 година – класификацията по OXFORD – MEST - C.

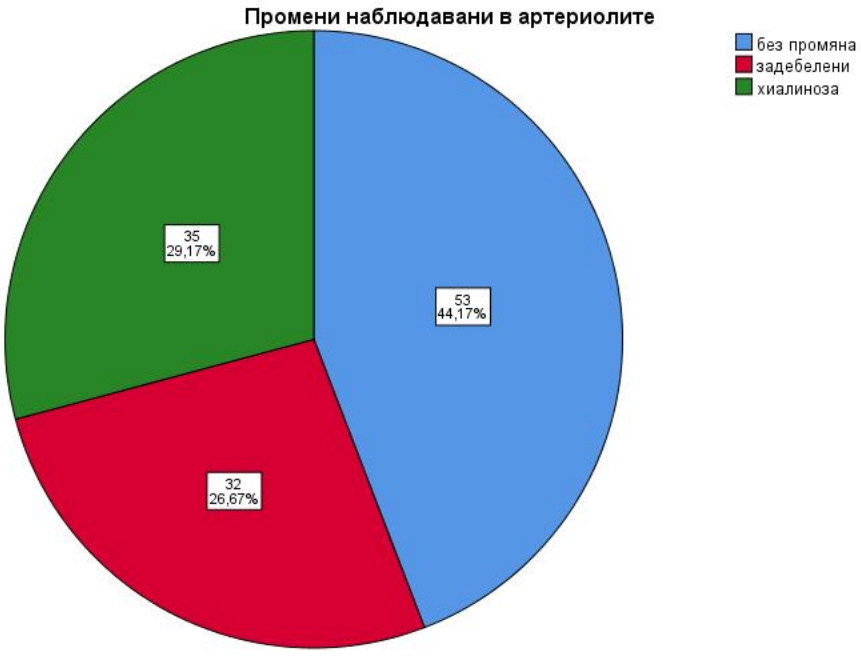
4.3.1 Класификацията по Haas

Според класификацията на Haas при 19 (15,2%) от пациентите е установен ИгАН - с минимални хистологични промени (лезии), при 44 (35,2%) – огнищно-сегментен склеротичен гломерулонефрит, при 28 (22,4%) – огнищно-сегментен пролиферативен гломерулонефрит, 30 (24%) – дифузен пролиферативен гломерулонефрит, 4 (3,2%) – напреднал склеротичен гломерулонефрит, Фигура 12.



Фигура 12 Хистологичен анализ на резултата от ПББ, класифициран по Haas

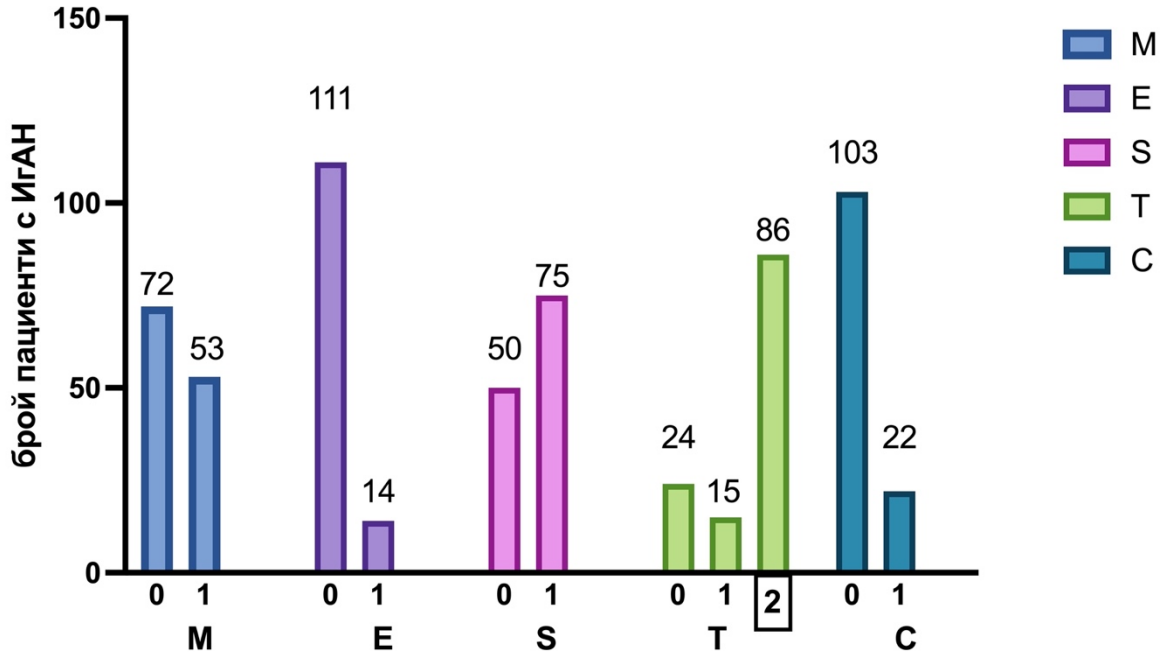
Един от минусите на класификацията по Haas е именно фокусиране само върху промените наблюдавани в бъбречния гломерул. Ето защо тук ще отбележим, че при пациентите, освен описаните промени в бъбречния гломерул, се наблюдават и редица такива в тубулите, както и в артериолите. Наблюдаваните промени в бъбречните артериоли са разпределени, както следва: без промяна 53 (42,4), задебелени 32 (25,6), хиалиноза (35), Фигура 13.



Фигура 13 Наблюдавани хистологични промени в артериолите при пациенти с ИгАН

4.3.2 Класификацията по OXFORD – MEST-C

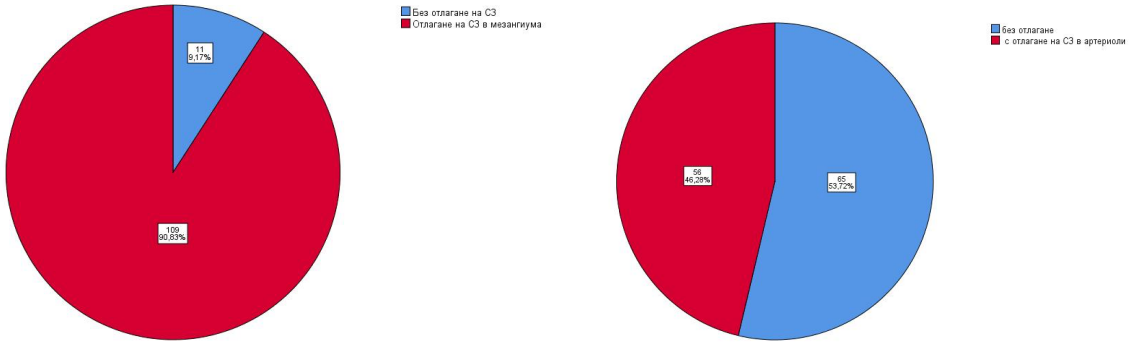
Хистологичният анализ, на базата на класификацията по OXFORD, е установил наличието на мезангиален хиперцелуларитет (M1) при 53 (42,4%) пациенти, ендокапилярен хиперцелуларитет (E1) при 14 (11,2%), сегментна гломерулосклероза (S1) при 75 (60.0%), а тубулна атрофия/интерстициална фиброза (T1/T2) при 101 (68.8%). Резултатите са представени на Фигура 14. При 22 (17,6%) от пациентите се установяват полулуния, като при 8 от тях болестта се изявява като бързо-прогресиращ гломерулонефрит.



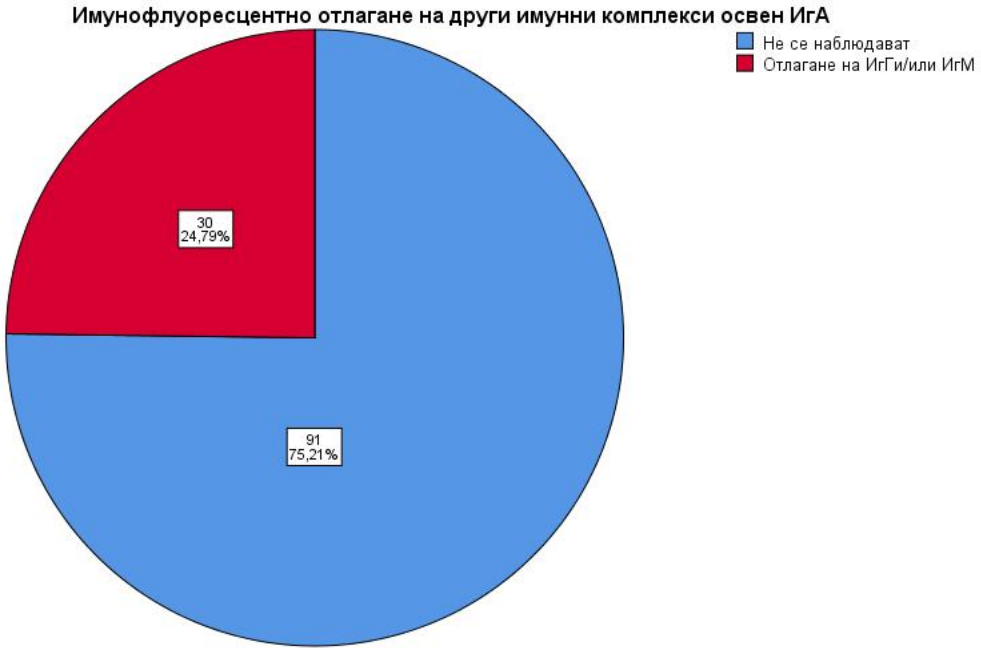
Фигура 14 Разпределение на патохистологичните характеристики на 125 бъбречни биопсии на базата на класификацията по OXFORD- MEST-C

4.3.3 Имунофлуоресцентно изследване

Диагнозата ИгАН е немислима без провеждането на имунофлуоресцентно изследване. При изследваната от нас кохорта болни при 100 % от тях е проведен анализ на материала от ПББ и чрез имунофлуоресценция. Резултатите показват, че при 100% от болните се установява отлагане на ИгА в мезангиума, при 109 (87,2) се установява отлагане на С3 в мезангиума, а при 56 (44,8) отлагане на С3 в стени на артериоли. При 31 (24,8) от болните, освен мезангиално отлагане на ИгА и С3 (Фигура 15), се установява и отлагане на ИгГ и/или ИгМ, Фигура 16.



Фигура 15 Отлагане на С3 с мезангиум и стени на артериоли



Фигура 16 Имунофлуоресцентно отлагане в мезангиум на ИгГ и ИгМ

4.4 Оценка на фактори влияещи върху тежестта на заболяването при поставяне на диагнозата

4.4.1 Корелационна зависимост между клинико-лабораторните характеристики и хистологичния стадий при поставяне на диагнозата

За да определим влиянието на определени клинико-лабораторни характеристики върху хистологичния вариант на болестта, проведохме няколко корелационни анализа. Проследяваните от нас пациенти имат анамнеза за редица придружаващи заболявания, като, както беше посочено на Таблица 4-1, най-висока е честотата на вторичната артериална хипертония, хиперурикемия, гърлени инфекции, прекаран вирусен хепатит

А. Доказано е, че дългогодишната артериална хипертония води до вторична нефропатия, като промените са предимно в артериолите. В анализа се добавиха всички пациенти с чести гърлени инфекции и прекаран вирусен хепатит, не само поради високата честота сред популацията, но и защото тези две състояния водят до дразнене на лигавичния имунитет, водещо до повишен имунен отговор и секреция на антитела. От Таблица 4-5 става ясно, че няма сигнификантна зависимост между наличието на артериална хипертония, анамнеза за обриви, анамнеза за гърлени инфекции в миналото, както и анамнеза за прекарана инфекция с хепатит и хистологичния стадий на болестта по Haas. Тук трябва да се уточни, че това са пациенти с анамнеза за прекаран вирусен хепатит, при които няма данни за активност на болестта, както и категорично е отхвърлено наличието на вирусна репликация. Този резултат разкрива една от слабостите на класификацията по Haas, а именно, че в нея не се включват промените в структурата на артериолите, най-типичния белег за хистологични промени при хипертония, а се фокусира единствено върху гломерулните промени.

Таблица 4-5 Зависимост между придружаващите заболявания артериална хипертония, обрив, гърлени инфекции в миналото, хепатит и хистологичния стадий на болестта.

Придружаващи заболявания	Чес-тота	Стадий на ПББ по Haas				
		Минимални хистологияни промени	Огнищно-сегментен склеротичен ГН	Огнищно-сегментен пролифе-ративен ГН	Дифузен пролифе-ративен ГН	Напреднал склеро-тичен
Артериална хипертония	n	8	26	19	22	4
	%	53,3[a]	59,1[a]	67,9[a]	73,3[a]	100,0[a]
Обрив	n	2	1	3	3	0
	%	13,3[a]	2,3[a]	10,7[a]	10,0[a]	0,0[a]
Гърлени инфекции в миналото	n	5	8	9	12	1
	%	33,3[a]	18,2[a]	32,1[a]	40,0[a]	25,0[a]
Хепатит	n	2	6	4	3	0
	%	13,3[a]	13,6[a]	14,3[a]	10,0[a]	0,0[a]

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

Ето защо допълнително се проведе анализ за оценка зависимостта между наличието на артериална хипертония и наличието на хистологичните промени в артериолите, където се установи сигнификантна разлика, Таблица 4-6. Като относителният дял на пациентите имащи артериална хипертония е статистически достоверно по-висок при пациентите с хиалиноза спрямо тези без промени в артериолите, но не и спрямо пациентите имащи данни за задебеляване на артериоли, чийто процент не се различават статистически от тези на другите две категории.

Таблица 4-6 Зависимост между артериална хипертония и промени в артериолите.

Показател	Честота	Промени в артериолите		
		Запазени	Задебелени	Хиалиноза
Артериална хипертония	n	28	21	29
	%	52,8[a]	65,6[ac]	82,9[bc]

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

Проведе се и анализ между посочените параметри и класификацията по OXFORD-MEST-C. Пациентите се разделиха на две групи, съобразно получения резултат по Oxford-MEST-C, съответно тези с резултат <3 (MEST-C<3) и ≥3 (MEST-C≥3). Не се установи сигнификантна зависимост между наличието на артериална хипертония, анамнеза за обрив и гърлени инфекции в миналото, прекаран вирусен хепатит и хистологични стадий на болестта, класифициран по Oxford, MEST-C < 3 или MEST-C ≥3,Таблица 4-7.

Таблица 4-7 Зависимост между придружаващите заболявания: артериална хипертония, обрив, чести гърлени инфекции в миналото, хепатит и хистологичния стадий на болестта (MEST>2)

Придружаващи заболявания	Честота	MEST скор		P
		< 3	≥ 3	

Артериална хипертония	n	49	32	0,449
	%	68,1	60,4	
Обрив	n	4	6	0,321
	%	5,6	11,3	
Гърлени инфекции в миналото	n	23	14	0,556
	%	31,9	26,4	
Хепатит	n	10	5	0,581
	%	13,9	9,4	

Корелационна зависимост се потърси и между някои биохимични показатели и стадия на болестта. От лабораторните показатели се фокусирахме върху серумния креатинин, като фактор, даващ възможност за оценка на тежестта на болестта, спрямо хистологичните промени. Установихме статистически значима зависимост между хистологичния стадий и стойностите на серумния креатинин при поставяне на диагнозата, Таблица 4-8. При клас 2: огнищно-сегментен гломерулонефрит средната стойност е статистически достоверно по-висока спрямо тези при клас 1: минимални хистологични лезии и клас 4:дифузен пролиферативен, но не и спрямо клас 3: огнищен пролиферативен, чиято средна стойност не се различава статистически от тези на останалите категории. Това ни дава възможност за заключим, че при пациентите с по-високи стойности на серумния креатинин при поставяне на диагнозата, респективно по-напреднал стадий на бъбречно заболяване, може да очакваме предимно белези на хроничност, каквито са склеротичните гломерулни промени, характерни за клас 2, а не белези на активност: мезангиалната пролиферация или мезангиален хиперцелуларитет, типични за клас 3 и 4.

Таблица 4-8 Зависимост между стойностите на серумния креатинин при поставяне на диагнозата и хистологичния стадий на болестта.

Хистологичен стадий на болестта	Серумен креатинин при поставяне на диагнозата		
	n	$\overline{X}$	SD

Минимални хистологични промени	15	96,73[a]	24,93
Огнищно-сегментен склеротичен гломерулонефрит	44	135,09[bc]	53,24
Огнищен-сегментен пролиферативен	28	125,71[ac]	70,74
Дифузен пролиферативен	30	117,37[a]	69,32
Склеротичен*	4	271,25	132,46

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

** - тази категория не участва в анализ поради липса на статистическа представителност

Липса на сигнификантна зависимост се наблюдава между стойностите на серумния креатинин, при поставяне на диагнозата, и хистологичния стадий на болестта по MEST, Таблица 4-9.

Таблица 4-9 Зависимост между стойностите на серумния креатинин при поставяне на диагнозата и MEST>2.

Показател	MEST скор						P
	< 3			≥ 3			
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
Серумен креатинин при поставяне на диагнозата (µmol/l)	72	121,63	61,91	53	133,62	75,19	0,560

Друг лабораторен показател, които оценихме като фактор, евентуален предиктор за тежестта на болестта, е наличието на хематурия. Въпреки значително по-високия брой пациенти (28) с данни за макроскопска хематурия в групата на клас II по Haas, не се установи сигнификантна зависимост между наличието на хематурия (микроскопска,

разделена в три класа според резултат от проведено изследване с тест лента - Dipstick - 1+ до 3+), анамнеза за епизод/епизоди на макроскопска хематурия и хистологични стадий на болестта, Таблица 4-10.

Таблица 4-10 Зависимост между наличието на кръв в урината, епизод на макроскопска хематурия и хистологичния стадий на болестта

Показатели		Чес-тота	Стадий на ПББ по Haas				
			Минимални хистологични промени	Огнищно-сегментен склеротичен	Огнищно-сегментен пролифе-ративен	Дифузен пролифе-ративен	Напреднал склеро-тичен
Кръв в урина							
	1+	n	8	28	11	10	3
		%	53,3[a]	63,6[a]	39,3[a]	33,3[a]	75,0[a]
	2+	n	1	6	3	6	1
		%	6,7[a]	13,6[a]	10,7[a]	20,0[a]	25,0[a]
	3+	n	6	10	14	14	0
		%	40,0[a]	22,7[a]	50,0[a]	46,7[a]	0,0[a]
Макроскопска хематурия (епизод)		n	6	28	18	17	3
		%	40,0[a]	63,6[a]	64,3[a]	56,7[a]	75,0[a]

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

Този резултат отново може да бъде асоцииран с липсата на специфична оценка на тубулните промени в класификацията по Haas. Ето защо проверихме и наличието на корелационната зависимост между наличието на хематурия (3 стадия, спрямо резултата от изследването на урина с помощта на тест лента) и хистологичните промени, класифицирани по OXFORD – MEST - C, където се включват тубулните изменения. От Таблица 4-10 става ясно, че липсва сигнификантна зависимост между наличието на кръв

в урината, епизод на макроскопска хематурия, и хистологичния стадий на болестта (по MEST>2).

Таблица 4-11 Зависимост между наличието на кръв в урината, епизод на макроскопска хематурия и хистологичния стадий на болестта (MEST>2)

Показатели	Честота	MEST скор		P
		< 3	≥ 3	
Кръв в урината				0,937
1+	n	36	26	
	%	50,0	49,1	
2+	n	9	8	
	%	12,5	15,1	
3+	n	27	19	
	%	37,5	35,8	
Макроскопска хематурия	n	42	33	0,714
	%	58,3	62,3	

И при двата способа на класификация на хистология стадий на болестта, по Haas и MEST -C, не се установява зависимост с давността на оплакванията, Таблица 4-12, Таблица 4-13.

Таблица 4-12 Зависимост между давност на оплакванията и хистологичния стадий на болестта по Haas

Хистологичен стадий на болестта	Давност на оплакванията (месеци)		
	n	$\overline{X}$	SD
Минимални хистологични промени	12	23,58[a]	23,19

Огнищно-сегментен склеротичен ГН	44	28,25[a]	34,75
Огнищно-сегментен пролиферативен ГН	26	25,90[a]	43,60
Дифузен пролиферативен	28	18,82[a]	24,88
Напреднал склеротичен*	4	15,00	6,00

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

** - тази категория не участва в анализа поради липса на статистическа представителност

ГН, гломерулонефрит

Таблица 4-13 Зависимост между давност на оплакванията и MEST>2

Показател	MEST скор						P
	< 3			≥ 3			
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
Давност на оплакванията (месеци)	68	28,11	36,43	50	18,92	26,84	0,126

Не се установява статистически достоверна зависимост между наличието на хиперурикемия и промените в тубулите, Таблица 4-14.

Таблица 4-14 Зависимост между хиперурикемия и промени в тубулите (p=0,908)

Хиперурикемия	Честота	Промени в тубулите		
		Без изменения	25% фиброза	>25% фиброза
Не	n	12	56	9

	%	66,7[a]	65,1[a]	60,0[a]
Да	n	6	30	6
	%	33,3[a]	34,9[a]	40,0[a]

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

От Таблица 4-15 става ясно, че няма сигнификантна зависимост между описаните промени в артериолите и отлагането на C3 в тях.

Таблица 4-15 Зависимост между промени в артериолите и отлагането на C3 в артериоли.

Промени в артериолите	Честота	Отлагане на C3 в артериоли		P
		Няма	Има	
Запазени	n	5	48	
	%	45,5	44,0	
Задебелени	n	1	31	0,287
	%	9,1	28,4	
Хиалиноза	n	5	30	
	%	45,5	27,5	

4.4.2 Корелационна зависимост между ехографския образ и степента на ХБЗ по KDIGO при поставяне на диагнозата

На Таблица 4-16 се вижда, че:

- Съществува сигнификантно перманентно повишение на стойностите на серумния креатинин при поставяне на диагнозата с напредването на ехографския стадий на болестта;
- Подгрупата пациенти с напреднал дифузен бъбречен процес няма статистическа представителност, но подкрепя горното заключение.

Таблица 4-16 Зависимост между ехографския стадий на болестта и стойностите на серумния креатинин при поставяне на диагнозата.

Ехографски стадий на болестта	Стойност на серумния креатинин при поставяне на диагнозата		
	n	$\overline{X}$	SD
Нормален ехографски образ	23	102,78[a]	45,30
Дифузен бъбречен процес	96	124,99[b]	61,25
Напреднал дифузен бъбречен процес*	6	246,00[c]	118,35

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

** - тази категория няма статистическа представителност

4.5 Оценка на фактори влияещи върху прогресията на болестта

4.5.1 Корелационна зависимост между клинико-лабораторните характеристики и прогресията на болестта

Оценихме зависимостта между давността на оплакванията, пола, като фактори, които евентуално биха имали влияние върху прогресията на болестта. Като прогресията на болестта се дефинира по два способа: влошаване на стадия на ХБЗ на базата на еГФР или удвояване стойностите на серумния креатинин. Проведеният статистически анализ не установи наличие на статистически достоверна зависимост между давността на оплакванията и показателите: серумен креатинин при поставяне на диагнозата, прогресия на болестта на базата на еГФР през годините и прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин, Таблица 4-17, Таблица 4-18, Таблица 4-19.

Таблица 4-17 Зависимост между давност на оплакванията (в месеци) и стойностите на серумния креатинин при поставяне на диагнозата

Показател	Серумен креатинин при поставяне на диагнозата (μmol/l)	P

	≤ 104			> 104			
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
Давност на оплакванията (месеци)	54	22,18	31,24	64	25,94	34,39	0,395

Таблица 4-18 Зависимост между давност на оплакванията (в месеци) и прогресия на болестта на базата на ГФР през годините.

Показател	Прогресия на болестта на базата на GFR през годините						P
	Не			Да			
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
Давност на оплакванията (месеци)	60	20,94	25,60	53	27,81	38,74	0,831

Таблица 4-19 Зависимост между давност на оплакванията (в месеци) и прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин

	Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин						P
	Не			Да			
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
Давност на оплакванията (месеци)	93	23,02	29,50	23	26,39	42,02	0,770

Показаните резултати на Таблица 4-20, Таблица 4-21 не дават основание да се твърди, че съществува сигнификантна зависимост между половата принадлежност и

прогресията на болестта оценена по два способа: на базата на ГФР през годините и на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин.

Таблица 4-20 Зависимост между пол и прогресия на болестта на базата еГФР.

Пол	Честота	Прогресия на болестта на базата на GFR през годините		P
		Не	Да	
Мъже	n	42	40	0,423
	%	66,7	74,1	
Жени	n	21	14	
	%	33,3	25,9	

Таблица 4-21 Зависимост между пол и прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин.

Пол	Честота	Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин		P
		Не	Да	
Мъже	n	71	15	0,613
	%	71,7	65,2	
Жени	n	28	8	
	%	28,3	34,8	

4.5.2 Корелационна зависимост между хистологичните промени и прогресията на болестта

Оценихме подробно връзката между описаните хистологични промени и прогресията на болестта, на базата на ГФР през годините. Резултатите сочат, че нито един от двата способа за класификация (по Haas и MEST-C) не корелира статистически достоверно с прогресията на болестта на базата на еГФР през годините, Таблица 4-22, Таблица 4-23.

Таблица 4-22 Зависимост между стадия на ПББ по Haas и прогресията на болестта на базата на ГФР през годините.

Стадий на ПББ по Haas	Честота	Прогресия на болестта на базата на ГФР през годините		P
		Не	Да	
Незначителни хистологични промени	n	9	5	0,217
	%	14,8	9,6	
Огнищно-сегментен гломерулонефрит	n	23	20	
	%	37,7	38,5	
Огнищен пролиферативен	n	16	10	
	%	26,2	19,2	
Дифузен пролиферативен	n	13	13	
	%	21,3	25,0	
Склеротичен	n	0	4	
	%	0,0	7,7	

Таблица 4-23 Зависимост между стадия на ПББ по MEST>2 и прогресия на болестта на базата на GFR през годините.

Класификация по MEST>2	Честота	Прогресия на болестта на базата на GFR през годините		P
		Не	Да	
< 3	n	41	27	0,133
	%	65,1	50,0	
≥ 3	n	22	27	
	%	34,9	50,0	

- Отлагане на C3 в мезангиума

Изследвахме връзката между отлагането на C3 в мезангиума и прогресията на болестта, отново оценена по два способа: на базата на прогресия на ХБЗ според еГФР или удвояване стойностите на серумния креатинин. Резултатите сочат статистически значима зависимост между отлагането на C3 в мезангиума и прогресия на болестта на базата на еГФР, Таблица 4-24, а именно при 49 от болните с установена прогресия се открива отлагане на C3 в мезангиума.

Таблица 4-24 Зависимост между прогресията на болестта и мезангиалното отлагане на C3

Показател	Честота	Отлагане на C3 в мезангиума		P
		Няма	Има	
Прогресия на болестта на базата на ГФР през годините	n	4	49	0,05
	%	36,4	48,5	
Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин	n	2	21	1,000
	%	18,2	19,8	

И двата способа за определяне на прогресията на болестта не са в статистически значима зависимост с:

- Промени в артериоли, Таблица 4-25

Таблица 4-25 Зависимост между прогресията на болестта и промени в артериолите.

Показател	Честота	Промени в артериолите		
		Запазени	Задебелени	Хиалиноза
Прогресия на болестта на базата на GFR през годините	n	25	13	15
	%	49,0[a]	44,8[a]	46,9[a]
Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин	n	12	7	4
	%	23,1[a]	21,9[a]	12,1[a]

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

- Отлагане на фибрин, Таблица 4-26

Таблица 4-26 Зависимост между прогресията на болестта и отлагане на фибрин.

Показател	Честота	Отлагане на фибрин		P
		Няма	Има	
Прогресия на болестта на базата на GFR през годините	n	40	12	0,524
	%	48,2	40,0	
Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин	n	16	6	1,000
	%	18,6	18,8	

- Отлагане на C3 в артериолите, Таблица 4-27

Таблица 4-27 Зависимост между прогресията на болестта и отлагането на C3 в артериоли.

Показател	Честота	Отлагане на C3 в артериоли		P
		Няма	Има	
Прогресия на болестта на базата на GFR през годините	n	32	21	0,187
	%	53,3	39,6	
Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин	n	12	11	1,000
	%	19,0	20,0	

- Псевдолинеарно отлагане на други имунни комплекси, Таблица 4-28

Таблица 4-28 Зависимост между прогресията на болестта и псевдолинеарно отлагане на други имунни комплекси.

Показател	Честота	Псевдолинеарно отлагане на други имунни комплекси		P
		Няма	Има	
Прогресия на болестта на базата на ГФР през годините	n	42	10	0,502
	%	48,3	38,5	
Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин	n	15	7	0,415
	%	16,9	24,1	

4.6 Оценка на биомаркери, асоциирани с патогенезата на болестта, тяхната диагностична и прогностична роля

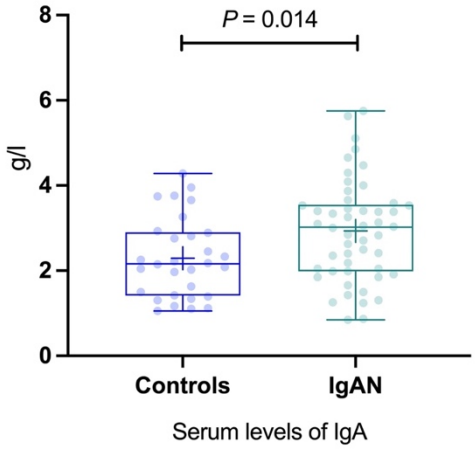
4.6.1 Серумни нива на ИгА при пациенти с ИгАН и здрави контроли

Много проучвания сочат, че серумните нива на ИгА са повишени при приблизително 60% от пациентите с ИгАН, сравнено със здрави доброволци.[177] Още повече, че при изследване на отложените ИгА в бъбречния гломерул се установява, че това са ИгА1 и Гд-ИгА1, което лежи в основата на патогенезата на болестта. За да потвърдим тези данни, описани в литературата, в нашето проучване се изследваха серумните нива на ИгА при 50 пациенти с ИгАН и 30 здрави контроли. В съответствие с констатации от други проучвания, се установи сигнификантна по-висока нива на ИгА (p=0,014) в групата на болните, Таблица 4-29, Фигура 17.

Таблица 4-29 Зависимост между серумните концентрации на Гд-ИгА1, ИгА и С3, отношенията Гд-ИгА1/ИгА и ИгА/С3, и принадлежността към контролите или групата на болните.

Показател	Основни групи						P
	Контроли			Болни			
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	

Гд-ИгА1	30	6022,49	4421,79	50	11882,38	13724,19	<0,001
ИгА	30	2,29	0,94	50	2,93	1,18	0,014
C3	30	1,31	0,25	50	1,36	0,31	0,658
Гд-ИгА1/ИгА	30	2552,91	1249,81	50	4458,26	5486,84	0,022
ИгА/C3	30	1,84	0,88	50	2,26	0,97	0,047
BAFF	30	1804,23	956,73	50	2660,40	6925,67	0,432
APRIL	30	0,57	1,67	50	1,017	2,71	0,227



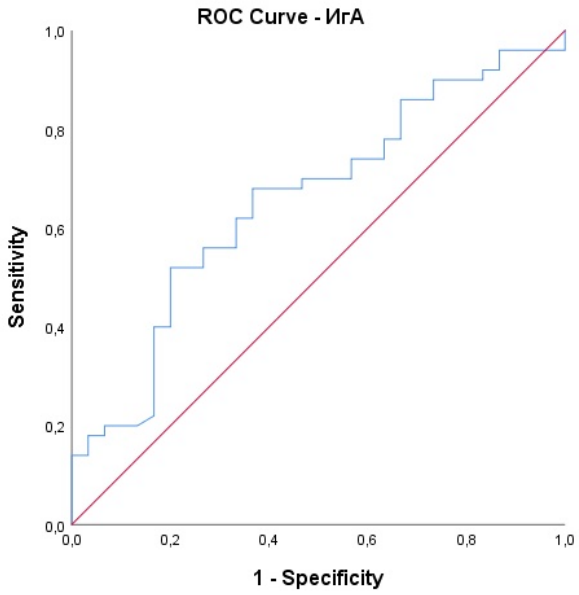
Фигура 17 Серумни нива на ИгА при пациенти с ИгАН и здрави контроли.

Проведе се и задълбочен анализ за оценка на диагностичната роля на серумните нива на ИгА. Данните сочат средното серумно ниво на ИгА 3,019 g/l (диапазон 0,849 - 5,749) за пациентите с ИгАН, в сравнение с 2,162 g/l (диапазон 1,056 - 4,281 g/l) за 30 здрави контроли (p=0,014). При 34 пациенти имаше серумна концентрация на IgA по-висока от 2,342 g/l. Това сочи чувствителност от 68,0% и специфичност от 63,3% с положителна предиктивна стойност от 75,6% и отрицателна предиктивна стойност от 54,3, Таблица 4-30.

Таблица 4-30 Чувствителност и специфичност за серумната концентрация на ИгА.

	КОНТРОЛИ		ПАЦИЕНТИ		ЧУВСТВИТЕЛНОСТ	СПЕЦИФИЧНОСТ	ПОЗИТИВНА ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ	НЕГАТИВНА ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ
	Да	Не	Да	Не				
ИгА>2.324	11	19	34	16	68.0%	63.3%	75.6%	54.3%

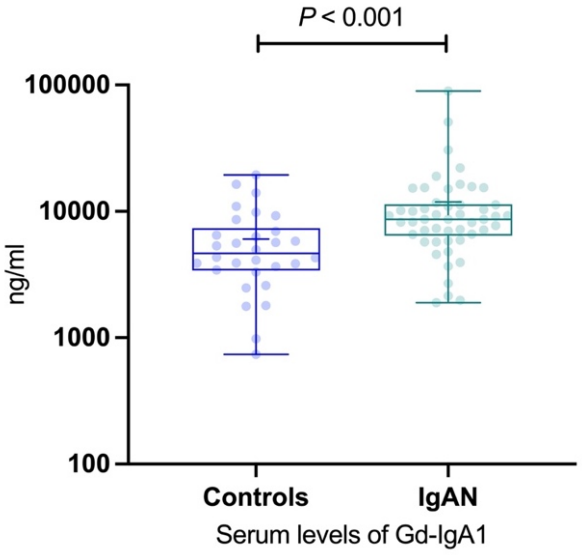
Отново, за да се илюстрира диагностичния потенциал, резултатите са представени и като ROC анализ, Фигура 18. Площта под кривата е 0,656 със стандартна грешка от 0,063, 95% доверителен интервал (CI) е 0,534-0,779 (p<000,1).



Фигура 18 ROC анализ на базата на серумните концентрации на ИгА.

4.6.2 Серумни нива на Гд-ИгА1 при пациенти с ИгАН и здрави контроли

За да се оцени диагностичната роля на Гд-ИгА1 се сравни серумната концентрация между двете популации: пациенти с ИгАН и здрави контроли. Резултатите сочат значително по-висока серумна концентрация на Гд-ИгА1 в групата на болните (p<0,001), Таблица 4-31, Фигура 19.



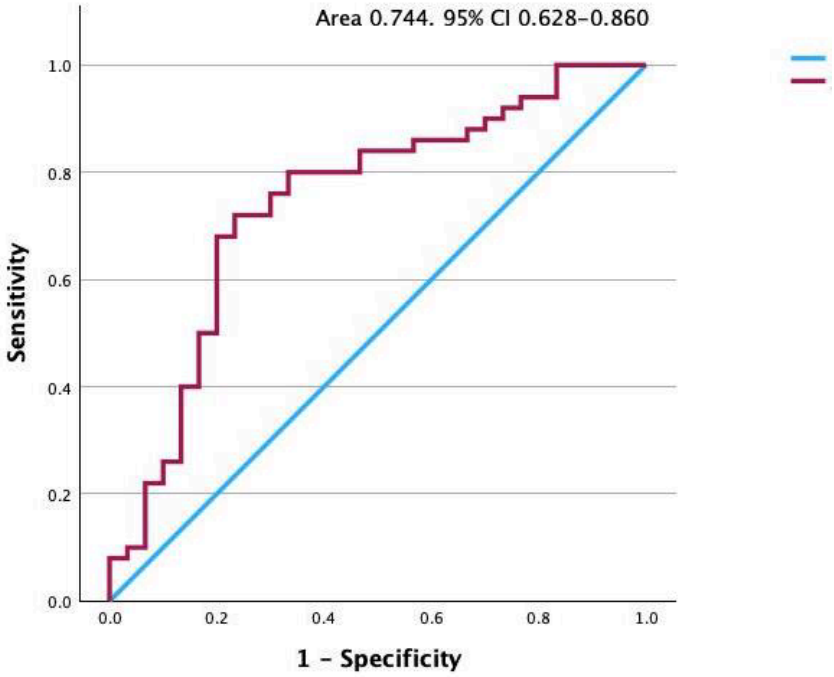
Фигура 19 Серумни нива на Гд-ИгА1 при пациенти с ИгАН и здрави контроли

Таблица 4-31 Зависимост между серумните концентрации на Гд-ИгА1, ИгА и С3, отношенията Гд-ИгА1/ИгА и ИгА/С3, и принадлежността към контролите или групата на болните.

Показател	Основни групи						P
	Контроли			Болни			
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
Гд-ИгА1	30	6022,49	4421,79	50	11882,38	13724,19	<0,001
ИгА	30	2,29	0,94	50	2,93	1,18	0,014
С3	30	1,31	0,25	50	1,36	0,31	0,658
Гд-ИгА1/ИгА	30	2552,91	1249,81	50	4458,26	5486,84	0,022
ИгА/С3	30	1,84	0,88	50	2,26	0,97	0,047

Средната серумна концентрация на Gd-IgA1 при пациентите с ИгАН е 8435 ng/mL (диапазон 1888–89 642ng/mL) е значително по-висока от тази при здравите контроли - 4315 ng/mL (диапазон 738–19 450 ng/mL), ($p < 0.001$). Серумното ниво на Gd-IgA е по-високо от 5698 ng/mL за 40 от 50 пациенти. Тези данни показват чувствителност от 80,0% и специфичност от 66,7%, с позитивна предиктивна стойност от 80,0% и негативна предиктивна стойност от 66,7%. Да се илюстрират потенциала на този анализ, резултатите също са представени с ROC крива на Фигура 20. Площта под кривата е 0,744 със стандартна грешка от 0,059, което показва, че процентът на истински положителни резултати е висок, а процентът на фалшиво положителни резултати е нисък. 95% доверителен интервал (CI) е 0,628–0,860 ($p <0,001$).

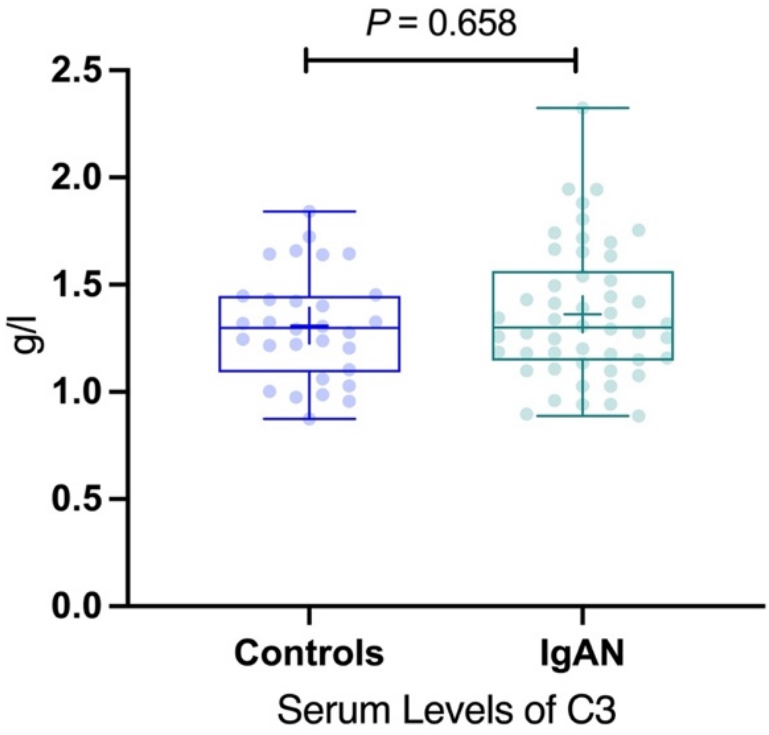
	КОНТРОЛИ		**ПАЦИЕНТИ**		**ЧУВСТВИТЕЛНОСТ**	**СПЕЦИФИЧНОСТ**	**ПОЗИТИВНА ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ**	**НЕГАТИВНА ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ**
	Да	Не	Да	Не				
Гд-ИгА1 >5698 ng/mL	11	19	40	10	80,0%	66,%	80,6%	66,7%



Фигура 20 ROC анализ на базата на серумните концентрации на Гд-ИгА1

4.6.3 Серумни нива на C3 при пациенти с ИгАН и здрави контроли

При много пациенти с ИгАН, в материала от ПББ, се установява както мезангиално отлагане на ИгА, така и компоненти от системата на комплемента, активирана по алтернативния или лектиновия път. При приблизително 90% от пациентите се наблюдава отлагане на C3 в бъбречния мезангиум, индикиращо важната роля на системата на комплемента в патогенезата на болестта. Има редица проучвания оценяващи ролята на C3 като евентуален предиктор на хода и тежестта на протичане. Корейско проучва сочи, че ниските циркулищи нива на C3 позитивно корелират с тежестта на отлагане на C3 в мезангиума, както и с риска от развитието на терминален стадий на хронично бъбречно заболяване. С оглед противоречивите данни в литературата, нашите резултати показване статистически независима разлика в серумните концентрации на C3 между пациентите с ИгАН и здрави контроли (p=0,658), Фигура 21.

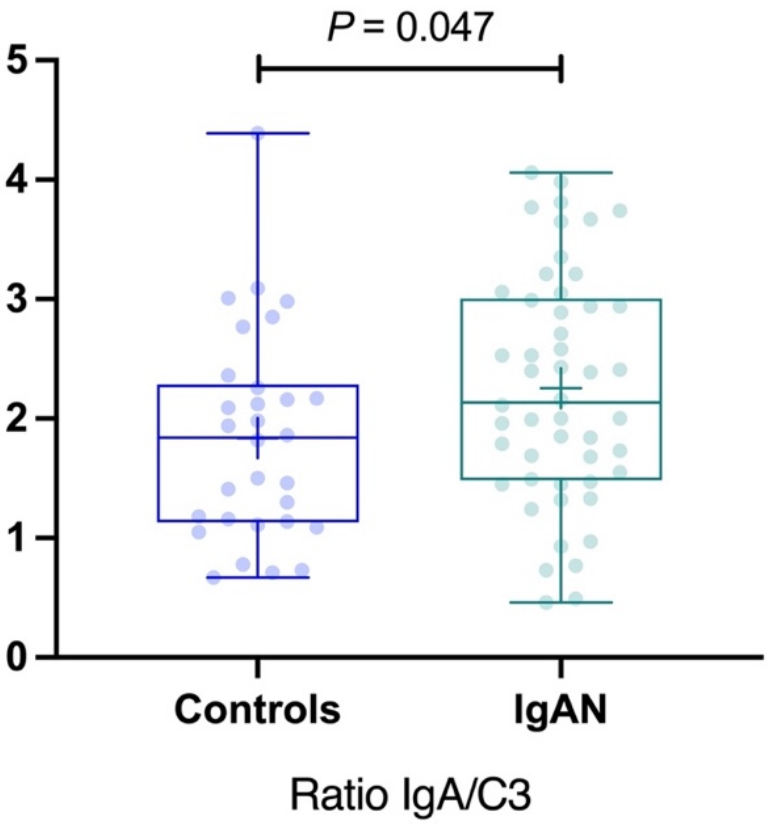


Фигура 21 Серумни нива на C3 при пациенти с ИгАН и здрави контроли

4.6.4 ИгА/С3 и Гд-ИгА1/ИгА съотношение при пациенти с ИгАН и здрави контроли

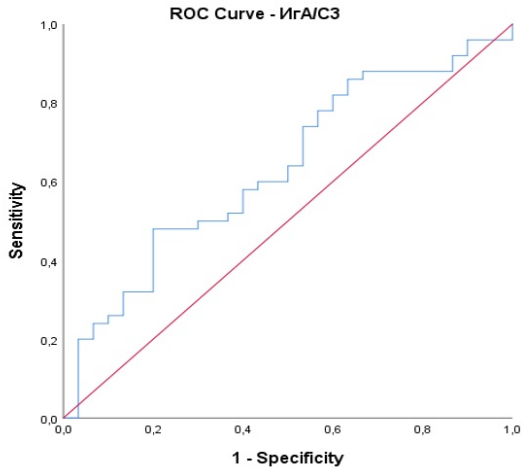
Тъй като при много пациенти с ИгАН има повишени серумни нива на ИгА, а в около 90% от случаите се наблюдава и мезангиално отлагане на С3, много клинични проучвания се фокусират върху съотношението ИгА/С3 като евентуален биомаркер, специфичен за болестта. Редица проучвания в Япония и Китай демонстрират завишени нива на ИгА/С3 при пациенти с ИгАН сравнено със здрави контроли или сравнено с пациенти с други гломерулни заболявания.[178–181]

В настоящия труд се проведе изследване на ИгА/С3 съотношение в двете популации. Резултатите сочат по-високи стойности за ИгА/С3 сред пациентите с ИгАН сравнено със здрави контроли (p=0,047), Таблица 4-31, Фигура 22.



Фигура 22 Съотношение ИгА/С3 сред пациенти с ИгАН и здрави контроли

При определяне съотношението ИгА/С3 средната стойност при пациентите с ИгАН е 2,137 (диапазон 0,461-4,062), отново значително по-ниска стойност за здравите контроли 1,84 (0,671-4,386), (p=0,047). Площта под кривата е 0,633 със стандартна грешка от 0,064, 95% CI - 0,508-0,758. Въпреки установената статистическа значима разлика между двете изследвани популации, резултатът не показва задоволителна чувствителност и специфичност, Фигура 23 ROC анализ на базата на серумната концентрация на ИгА/С3.



Фигура 23 ROC анализ на базата на серумната концентрация на ИгА/С3

4.6.5 Серумните биомаркери и прогресия на болестта

За да се изследва връзката между Гд-ИгА1, ИгА, ИгА/С3 и прогресията на болестта, пациентите се разделиха в две групи: „прогресори“ - пациенти, при които се установява намаляване на еГФР с 25% и/или влошаване на статия на ХБЗ по KDIGO, и втората група „непрогресори“ – съответно пациенти, при които не се изпълва нито един от посочените по горе критерии за влошаване на бъбречната функция. Характеристиките на двете групи е посочена на Таблица 4-32.

Таблица 4-32 Зависимост между серумните концентрации наГд-ИгА1 и ИгА, и прогресия на болестта на базата на ГФР през годините.

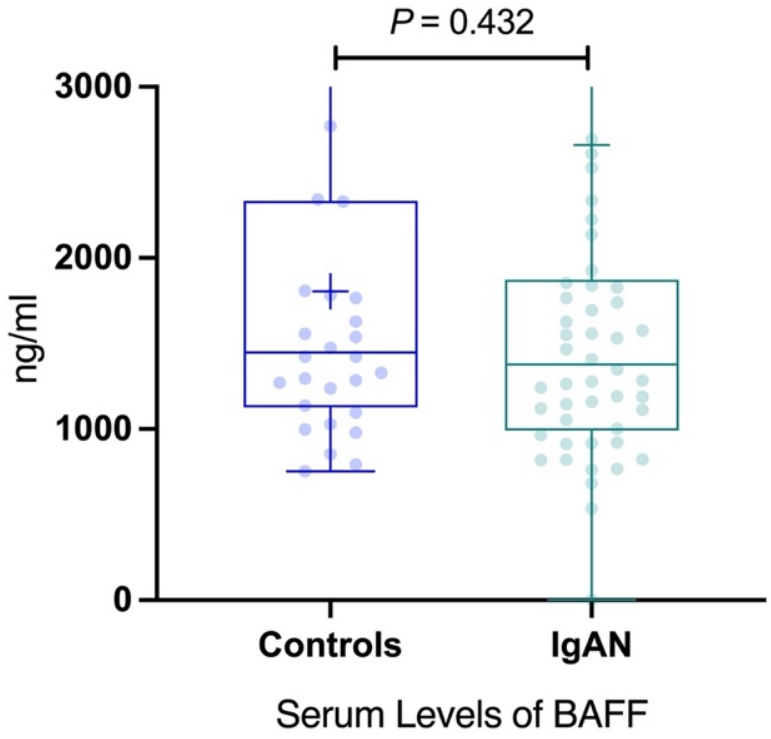
Показател	Прогресия на болестта на базата на GFR през годините						P
	Не			Да			
	n	$\overline{X}$	SD	n	$\overline{X}$	SD	
Гд-ИгА1	31	12353,24	16685,58	19	11114,14	6908,02	0,442
ИгА	31	2,79	1,23	19	3,16	1,10	0,407
Гд-ИгА1/ИгА	31	4905,12	6692,2	19	3729,16	2530,77	0,960
ИгА/С3	31	2,05	1,0	19	2,58	0.82	0,067

Както става ясно от таблица 5-29, сигнификантна зависимост между серумните концентрации на Гд-ИгА1, ИгА, Гд-ИгА1/ИгА, ИгА/С3 и ИгА, и прогресия на болестта, на базата на еГФР през годините, не бе установена. Това предполага, че посочените маркери не могат да се асоциират като евентуални предиктори на хода на болестта.

4.6.6 Серумни нива на BAFF при пациенти с ИгАН и здрави контроли

В клетката преминава през последователен процес на узряване, важна част от придобития имунитет, за да се стартира процес на синтез на антитела към чужди антигени. Тя притежава способността да се диференцира в плазматична клетка (плазмобласт), с кратък живот, както и в плазма клетка с дълъг живот, отговорна за продукцията на имуноглобулини. В-клетъчния активиращ фактор (B-cell activating factor, BAFF) и пролиферация-стимулиращ лиганд (proliferation-inducing ligand, APRIL), играят ключова роля, както върху Т-клетъчния зависим, така и върху Т-клетъчния независим стимулиращ сигнал върху В клетката, за да започне продукцията на ИгА –

вече от продуциращата ИгА+ В клетка. *In vitro* проучвания демонстрират, че култивирани В клетки, от пациенти с ИгА, при стимулация с APRIL и BAFF започват повишена продукция на Гд-ИгА1. На фона на тези резултати, както и големия брой клинични изпитвания на медикаменти, целящи блокирането на BAFF и APRIL, ние изследвахме серумните им концентрации сред 50 пациенти с ИгАН и 30 здрави контроли. Резултатите не установиха сигнификантно по-високи стойности на BAFF и APRIL сред пациентите с ИгАН, Фигура 24.

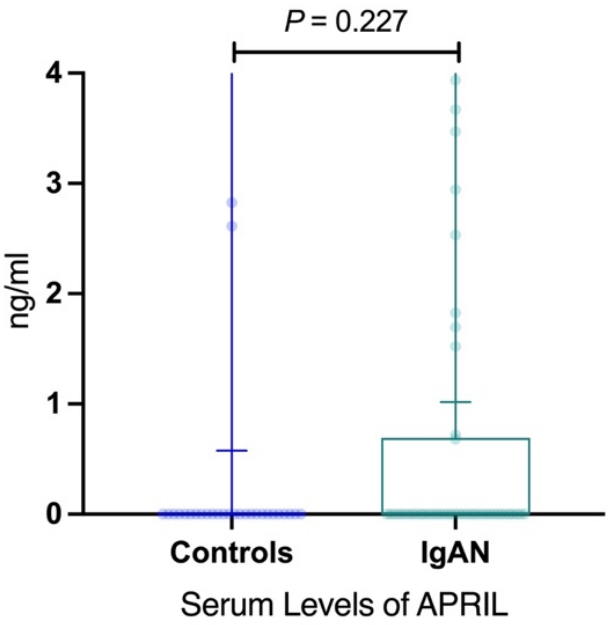


Фигура 24 Серумни нива на BAFF при пациенти с ИгАН и здрави контроли

4.6.7 Серумни нива на APRIL при пациенти с ИгАН и здрави контроли

APRIL също е от изключително важно значение за диференциацията на В клетката в плазма клетка, чрез свързването с TACI и/или BCMA.[182,183] Както Гд-ИгА1, така и анти-Гд-ИгА1 антитела се продуцират от плазма клетките, разположени в лигавицата, като е доказано, че APRIL води до стимулиране на В клетката в ИгА продуцираща. *In vitro* проучвания демонстрират, че култивирани В клетки, от пациенти с ИгА, при стимулация с APRIL резултат е повишена продукция на Гд-ИгА1. Познавайки ключовата роля на BAFF и APRIL в продукцията на Гд-ИгА1, както и автоантителата насочени с/у Гд-ИгА1, логично е да се търсят терапевтични варианти насочени към блокирането им. Редица предклинични и клинични проучвания целят да установят

ефективността от инхибицията на BAFF и APRIL. Няколко клинични проучвания сочат по-високи серумни нива на BAFF и APRIL сред пациенти с ИгАН (49,76,84,85). Установява се и връзка между серумната концентрация на APRIL и тежестта на ИгАН, както хистологично, така и клинично. Ние не установяваме по-високи серумни концентрации на APRIL сред пациентите с ИгАН, Фигура 25.



Фигура 25 Серумни нива на APRIL при пациенти с ИгАН и здрави контроли

4.7 Оценка на ефективността от проведените терапевтични протоколи

За да се оцени ефективността от проведените терапевтични протоколи, пациентите са разделени в седем групи в зависимост от прилаганото лечение: поддържаща терапия; ACE-инхибитори/АРБ; кортикостероид; комбинация ACE-инхибитори/АРБ и кортикостероид; комбинация с кортикостероид и циклофосфамид; комбинация кортикостероид и азатиоприн; комбинация кортикостероид, циклофосфамид, след което азатиоприн. Под „поддържаща терапия“ дефинираме: корекция на рискови фактори влияещи върху прогресията на болестта, промяна в качеството на живот, добър контрол на артериалното налягане с медикамент различен от ACE-инхибитори и/или АРБ. За да се оцени ефективността от проведените терапевтични схеми се сравни прогресията на болестта в седемте групи. Прогресията се дефинира по два способа: удвояване на стойностите на серумния креатинин, от една страна , и от друга - влошаване

в стадия на ХБЗ по KDIGO, базиран на , при проследяване на пациентите за период от 69±29,19месеца. Друг основен маркер за оценка на резултат от лечение, използван в литературата и препоръките за лечение на ИгАН, е и 24/часовата протеинурия. Ето защо допълнително се оцени степента на протеинурия в хода на терапията за всяка една група. Проведеният непараметричен анализ демонстрира следните резултати:

4.7.1 Лечение с ACEi/ARB

Лечението с ACEi/ARB, при пациентите с ИгАН, е заложено като стандарт според препоръките за добра клинична практика на KDIGO, при всички протеинурични пациенти, независимо от това дали имат или не хипертония. Сред проследената от нас популация, терапия с ACEi/ARB е приложена при 92 (73,6%), а съответно 33 (26,4) не са лекувани с тези медикаменти, по различни причини. Лечението с ACEi/ARB не е предпочетено поради намалена еГФР под 30мл/мин, непоносимост или лабораторни данни за хиперкалиемия. За да оценим ефективността от лечението с тази група, проведохме непараметричен корелационен анализ. Установи се статистически достоверна зависимост между липсата на прогресия на болестта и лечението с ACEi/ARB, сочещо че при 38 от болните лекувани с тези медикаменти не се установява прогресия на болестта, Таблица 4-33.

Таблица 4-33 Зависимост между прогресията на болестта и лечението с ACE.

Показател	Честота	Лечение с ACE		P
		Не	Да	
Прогресия на болестта на базата на ГФР през годините	n	15	38	0,05
	%	51,7	44,2	
Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин	n	9	13	0,099
	%	30,0	14,4	

4.7.2 Лечение само с кортикостероид

Терапевтичните схеми при пациентите с ИгАН се променят изключително интензивно през последните няколко години. Лечението с кортикостероид е дискутабилно. Последните препоръки за добра клинична практика на KDIGO от 2021година съветват

добавянето на кортикостероид при пациенти с ИгАН да бъде обсъдено, след 90 дневен прием на ACEi/ARB и персистираща протеинурия над 1г/дневно. Поради установените ползи от терапията с ACEi/ARB, доказаният ренопротективен и антипротеинуричен ефект, сред проследените от нас пациенти, броят на болните, при които е провеждана терапия само с кортикостероид, без ACEi/ARB или друг имуносупресор, е нисък. 78 (62,4%) от болните е приложено лечение с кортикостероид, съответно при 47 (37,6) не е приложено. От проведени анализ не се установи статистически достоверна зависимост между прогресията на болестта и лечението с кортикостероид, Таблица 4-34

Таблица 4-34 Зависимост между прогресията на болестта и лечението с КС.

Показател	Честота	Лечение с кортикостероид		P
		Не	Да	
Прогресия на болестта на базата на ГФР през годините	n	17	37	0,130
	%	37,0	52,1	
Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин	n	8	15	0,813
	%	16,7	20,3	

4.7.3 Лечение с кортикостероид и ACEi/ARB

Комбинирана терапия с ACEi/ARB+кортикостероид е приложена при 24 (19,2) пациенти. Прогресията на болестта на базата на GFR през годините корелира статистически достоверно с проведеното лечение включващо 7 варианта: поддържаща терапия, лекувани само с ACEi/ARB, лекувани с КС, КС+ ACEi/ARB, КС+Азатиоприн, КС+Циклофосфамид и КС+Циклофосфамид+Азатиоприн. Зависимостта се изразява в по-висок относителен дял на лекуваните с ACEi/ARB +КС при нямащите прогресия и по-висок процент на лекуваните с КС+Циклофосфамид при имащите прогресия, Таблица 4-35.

Таблица 4-35 Зависимост между приложената терапия и прогресия на болестта на базата на GFR през годините.

Терапия	Честота	Прогресия на болестта на базата на еГФР през годините		
		Не	Да	
„Поддържаща т-я“	n	8	7	0,962
	%	12,7	13,0	
Само с АСЕ	n	19	10	0,146
	%	30,2	18,5	
Само с КС	n	2	1	0,661
	%	3,2	1,9	
ACEi/ARB +КС	n	15	4	0,017
	%	23,8	7,4	
КС+азатиоприн	n	4	3	0,874
	%	6,3	5,6	
КС+циклофосфамид	n	12	26	<0,001
	%	19,0	48,1	
КС+азатиоприн+циклофосфамид	n	3	3	0,846
	%	4,8	5,6	

Проведеният статистически анализ относно наличието на зависимост между прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин и същата терапия със 7 варианта не установи сигнификантна такава, Таблица 4-36.

Таблица 4-36 Зависимост между приложената терапия и прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин.

Терапия	Честота	Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин		P
		Не	Да	
„Поддържаща т-я“	n	12	4	0,101
	%	12,1	17,4	
ACEi/ARB	n	26	4	
	%	26,3	17,4	
КС	n	2	1	
	%	2,0	4,3	
КС+ ACEi/ARB	n	21	1	
	%	21,2	4,3	
КС+Азатиоприн	n	7	0	
	%	7,1	0,0	
КС+Циклофосфамид	n	27	11	
	%	27,3	47,8	
КС+Циклофосфамид+Азатиоприн	n	4	2	
	%	4,0	8,7	

4.7.4 Лечение с кортикостероид и циклофосфамид

Добавянето на циклофосфамид към терапията с кортикостероид е изключително дискутабилна при пациентите с ИгАН, като резултатите според различните клинични проучвания е разнородна. Ето защо препоръките се фокусират върху индивидуалния подход при всеки болен, строга оценка на тежестта на изява на болестта и

хистологичния резултат. Сред изследваната от нас популация, комбинация кортикостероид + циклофосфамид е приложена при 15 (12%) от пациентите. Резултатите сочат статистически достоверна зависимост между прогресията на болестта и лечението с кортикостероид + циклофосфамид, като е по-висок процент на лекуваните с КС+Циклофосфамид при имащите прогресия, Таблица 4-35.

4.7.5 Лечение с комбинация с кортикостероид и азатиоприн

Комбинацията кортикостероид + азатиоприн е приложена при 42 (33,6%). Сигнификантна зависимост се установява между прогресия на болестта на базата на еГФР през годините и лечението с азатиоприн – статистически значимо повече са лекуваните с този медикамент, но същият вид лечение не корелира с показателя прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин, Таблица 4-37.

Таблица 4-37 Зависимост между прогресията на болестта и лечението с Азатиоприн

Показател	Честота	Лечение с Азатиоприн		P
		Не	Да	
Прогресия на болестта на базата на ГФР през годините	n	28	26	0,011
	%	37,3	63,4	
Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин	n	16	7	0,809
	%	20,0	17,1	

Прогресията на болестта на базата на ГФР през годините и на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин не са в сигнификантна зависимост с проведената терапия включваща три варианта: поддържаща терапия, лекувани само с ACEi/ARB и лекувани с КС и азатиоприн, таблица Таблица 4-38, Таблица 4-39.

Таблица 4-38 Зависимост между приложената терапия и прогресия на болестта на базата на GFR през годините.

Терапия	Честота	Прогресия на болестта на базата на ГФР през годините	P

		Не	Да	
„Поддържаща т-я“	n	8	7	
	%	25,8	35,0	
Лекувани само с ACEi/ARB	n	19	10	0,721
	%	61,3	50,0	
Лекувани с КС+Азатиоприн	n	4	3	
	%	12,9	15,0	

Таблица 4-39 Зависимост между приложената терапия и прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин.

Терапия	Честота	Прогресия на болестта на базата на удвояване стойностите на серумния креатинин		P
		Не	Да	
Поддържаща терапия	n	12	4	
	%	26,7	50,0	
Лекувани само с АСЕ/АРБ	n	26	4	0,362
	%	57,8	50,0	
Лекувани с КС+Азатиоприн	n	7	0	
	%	15,6	0,0	

4.7.6 Ефект от прилаганите терапевтични режими и степента на протеинурия

Статистически достоверна зависимост между приложената терапия (включваща 7 варианта: „поддържаща терапия“; с ACEi/ARB; с кортикостероид; комбинация с ACEi/ARB и кортикостероид; комбинация кортикостероид и циклофосфамид; комбинация кортикостероид и азатиоприн; комбинация кортикостероид,

циклофосфамид, след което азатиоприн) и степента на протеинурията на първа година, сравнено с нивото на протеинурия при поставяне на диагнозата - не бе установена, Таблица 4-40.

Таблица 4-40 Зависимост между приложената терапия и отговор (протеинурията на първа година, сравнено с нивото на протеинурия при поставяне на диагнозата).

Терапия	Честота	Отговор		P
		Не	Да	
Поддържаща терапия	n	3	11	
	%	15,8	11,8	
АСЕ/АРБ	n	6	22	
	%	31,6	23,7	
КС	n	1	2	
	%	5,3	2,2	
КС+АСЕ/АРБ	n	4	14	0,605
	%	21,1	15,1	
КС+Азатиоприн	n	0	8	
	%	0,0	8,6	
КС+Циклофосфамид	n	5	30	
	%	26,3	32,3	
КС+Циклофосфамид+Азатиоприн	n	0	6	
	%	0,0	6,5	

5 Обсъждане

ИгАН е гломерулонефритът с най-висока честота по света и водеща причина за хронично бъбречно заболяване и бъбречна недостатъчност. Новостите и научния интерес към болестта през последните години е изключителен. Въпреки високата честота, патогенезата на болестта остава ненапълно изяснена, а терапевтичните режими и препоръки имат ондулиращ ход. Настоящият дисертационен труд е с голяма значимост предвид високата честота на пациентите, диагностицирани с това заболяване и в нашата страна. Получените резултати „хвърля светлина“ върху епидемиологичните, клиничните и морфологичните характеристики сред българската популация. Факт е, че Jean Berger описва болестта през 1968 и една от последните му статии "Worldwide Perspective of IgA Nephropathy“ – “Световни перспективи за ИгА нефропатия”, публикувана през 1988, включва споделени данни от българския нефролог, изследовател и автор на редица статии за ИгАН – проф. Беловеждов, данни от 1984.[184] Това е една от последните научни статии, включваща епидемиологични данни за българската популация. Друг бележит автор, споделящ научния и професионалния си опит във връзка с ИгАН, е проф. Киперова, със защитаването на дисертационен труд през 1990г. Този дълъг период категорично демонстрира необходимостта от осъвременяване на данните сред българската популация, предвид новите познания, класификации и препоръки за лечение на болестта.

Доказателство за актуалността на темата е и изключително високият брой клинични изпитвания, провеждащи се през последните години, в търсенето на специфична терапия (активните клинични изпитвания до юни 2024 години е около 22). Научната работа представя данни, базирани на проследяване на пациентите в период между 7 и 10 години (средно 69,6±22,19 месеца), което ни позволява да оценим задълбочено прогресията на болестта, провежданите терапевтични режими и категорично да заявим необходимостта от специфично лечение и индивидуален подход.

Проведеният ретроспективен моноцентричен анализ обхваща период от 10 години, от 2010 г. до 2020 г., и включва 125 пациенти с биопсично потвърдена диагноза – ИгАН, като всички пациенти са диагностицирани, биопсирани и проследявани от екипа на клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“. Основни цели на нашето изследване са: да изучим епидемиологията на ИгАН, да разберем клиничната презентация, да установим фактори влияещи върху тежестта на заболяването, да

идентифицираме потенциални рискови фактори за прогресия и да оценим диагностичната и прогностичната роля на нови биомаркери. Изследването оценява използваните терапевтични режими, като дава възможност да се проследи и еволюцията на болестта на 1,3,5,7 година, след поставяне на диагнозата. Получените резултати дават възможност за актуализиране на научната информация сред българската популация.

ИгАН засяга и двата пола, като много клинични проучвания сочат значителен превес в честотата за мъжки пол. Нашите данни установената по-висока заболеваемост сред мъжете (70,4%), съотношение мъже : жени 2,4:1 (мъже 88, жени 37), както и изключително младата възраст на засегнатите (средна възраст 35,94 ± 11,91). Тези резултати припознават типичния профил на пациентите с ИгАН. В емблематични проучвания включваща пациенти с ИгАН, като VALIGA и OXFORD, отново преобладава мъжкият пол, съответно 73% и 72%. Това значително превъзходство в честотата подчертава възможността за хормонално или генетично влияние върху развитието на ИгАН. Проучвания сочат, че тестостеронът може да увеличи продукцията на Гд-ИгА1. Освен това, генетични различия в регулаторни гени, свързания с имунния отговор, също могат да допринесат за половото различие в честотата на заболяването. Въпреки установената по-висока честота сред мъжете, ние не установяваме корелационна зависимост между пола и прогресията на болестта. Тези данни се потвърждават и от други автори, не откриващи връзка между пола и по-тежкото протичане на болестта при болните с ИгАН. Интересен факт е, че авторите сочат по-добър клиничен ход сред жените, при които е поставена диагнозата ОСГС или е доказан мембранозен гломерулонефрит, сравнено с мъжете, но не откриват разлика между двата пола при ИгАН. Данните също така установяват средна възраст на пациентите 35,94±11,91, както и най-висока честота (31) на болните във възрастовия интервал 18-29 години. Описаните епидемиологични характеристики още веднъж подчертава важността на научния труд, тъй като засегнатите са именно млади, пациенти в активна възраст, диагностицирани с хронично заболяване, имащо прогресивен ход.

Клинично ИгАН най-често се проявява с нефритен синдром: хематурия, артериална хипертония, олигурия, нискостепенна протеинурия. Типичен белег е асимптомната макроскопската хематурия, срещаща се в 40-50% от случаите, като първа изява на болестта. Много характерно е епизодът на макроскопската хематурия да се прояви в хода на инфекция на горни дихателни пътища, включително тонзилит или фарингит, много по-рядко след инфекция на отделителната система или гастроинтестиналния

тракт. Друг типичен симптом е лошият контрол на артериалното налягане, като при около 5% от пациентите първа изява може да е малигнена хипертония. В най-тежките случаи (по-малко от 10%), болестта може да се прояви под формата на остър гломерулонефрит, с клиниката на остра бъбречна увреда и недостатъчност. Системните симптоми са неспецифични, включват отпадналост, умора. При изследваната от нас популация от болни, вторична артериална хипертония се установява при 64,8% (81; мъже 62, жени 19). Чести гърлени инфекции, предхождащи епизод на хематурия, се установява при 37 (29,6) от болните. Хематурия (макроскопска и/или микроскопска) се наблюдава при 96%, а епизод на макроскопска при 50 (40%). Средната стойност на протеинурия е 1,34 ± 1,16г/24часа. Посочените резултати потвърждават характерните първи симптоми на болестта и сред проследените от нас болни, а именно: незадоволителен контрол на артериалното налягане, хематурия и умерена протеинурия. Трябва да се обърне внимание именно на данни за умерена протеинурия, а не нискостепенна такава. Това се асоциира с по-тежък клиничен ход и основен рисков фактор определящ прогресия на болестта.

През 2021 година KDIGO публикува последни актуални препоръки за добра клинична практика при лечение на ИгАН.[120,185] Трябва да се подчертае, че през последните години, когато се обсъжда ИгАН, често актуалните препоръки губят своя съвременен поглед много скоро поради изключително големите новости и търсенето на нови терапевтични възможност. Освен важността на поддържаща терапия, както и корекция на рисковите фактори, като тютюнопушене, обезитет, също така е обърнато и специално внимание на дългогодишна дискусията относно провеждането на тонзилектомия. Заключението е : „Тонзилектомия не се препоръчва за лечение на ИгАН“.[120,185] При рецидивиращи тонзилити, преценката за провеждане на манипулацията е според създадените национални напътствия. Насочва се вниманието и към няколко клинични проучвания в Япония, сочещи изключително добър резултат и постигането на пълна клинико-лабораторна ремисия след провеждането на тонзилектомия и пулс терапия с кортикостероид.[186,187] Подобни клинични проучвания, сред европеидната раса, не установяват положителен ефект върху бъбречната функция и прогресията на болестта, след провеждане на манипулацията.[188] При проследените от нас пациенти, препоръчана и проведена тонзилектомия се наблюдава само при 9. Поради малкия брой на случаи, не може да се направи статистически коректно заключение.

Проследените параметри, сред пациентите с ИгАН, са: хемоглобин, серумен креатинин, еГФР, пикочна киселина, холестерол, триглицериди, общ белтък, албумин, протеинурия, уринен седимент. Средна стойност на серумния креатинин е 125,71 ± 67,83, съответно изчислената средна стойност на еГФР 61,8мл/мин, при поставяне на диагнозата. Това отговаря на II стадий ХБЗ по KDIGO. Сравнено с други две големи проучвания включваща пациенти с ИгАН сред европеидната раса, нашите данни сочат значително по-ниска стойност на еГФР при поставяне на диагнозата, съответно 83 мл/мин при OXFORD Study и 73 мл/мин при VALIGA. „Червена лампа“ за значимостта на скринингови програма, както и необходимостта от повишаване на информираността на пациентите, е високия брой на болни 64 (51,2%) с еГФР под 60мл/мин, при поставяне на диагнозата. Фактът, че при повече от половината от пациентите, при поставяне на диагнозата, се установява и редукция на еГФР с ½ от нормалните стойности (ГФР 120мл/мин), категорично сочат за забавена диагностика. Това води след себе си и очакваните белези за хроничност, склероза от ПББ, данни за напредналост на болестта. При съпоставянето на данните ни и с други проучвания, включващи пациенти с ИгАН в Китай и Япония, съответно Zeng et al и Katafuch et al, разликата е още по-голяма, в негативен аспект. Авторите сочат средна стойност на еГФР - 85мл/мин от Zeng et al и 82мл/мин от Katafuch, при поставяне на диагнозата. По-ниската еГФР, сред изследваната от нас популация, съответно по-напредналия стадий на ХБЗ при поставяне на диагнозата, се базира на комбинация от фактори. Това може да се дължи на липсата на скринингови програми в страната, както и продължителния период между първата проява на симптомите и провеждането на ПББ – 24,22 ± 32,9 месеца. Тук отново ще подчертаем, че най-честият симптом, сред изследваната популация, е наличието на артериална хипертония. Диагноза, останала най-вероятно дълго време неразпозната, или лекувана под заключението есенциална, въпреки младата възраст на пациентите. Таблица 5-1 съпоставя нашите данни и тези, публикувани в едни от най-значимите трудове обхващащи пациенти с ИгАН в Европа и Азия. Получените от нас резултати и посочените клинични проучвания са сходни относно: възрастта на пациентите, по-високата честота сред мъжкия пол, средната стойност на протеинурия, периодът на проследяване, както и процентът болни, при които се наблюдава прогресията на болестта (18,4%), Таблица 5-1.

Таблица 5-1 Сравнение между клинико/патологични характеристики сред пациенти с ИгАН, описани в настоящия научен друг и други големи клинични проучвания

	НАСТОЯЩ НАУЧЕН ТРУД	OXFORD[189] STUDY	VALIGA[190] COHORT (ЕВРОПА)	ALAMARTINE ET AL.[191] (ФРАНЦИЯ)	ZENG ET AL.[192] (КИТАЙ)	KATAFUCHI ET AL. [193] (ЯПОНИЯ)
Брой пациенти (n)	125	265	1147	183	1026	702
Възраст (години, mean)	35.94	30	36	38	34	30
Мъже (%)	70.4	72	73	74,9	50	42
Протеинурия (g/day)	1.34	1.7	1.3	1.2	1.3	0.9
S Cr (µmol/l)	126.7					
eГФР (mL/min/1,73 m^2)	62	83	73	72	85	82
MEST lesions %						
M1	34.2	80	28	21	43	12
E1	9	42	11	14	11	42
S1	48.4	45	70	54	83	79
T1 and T2 (T2)	55.5 (9.7)		21 (3.6)	30 (10)	27.3 (3.3)	30 (12)
C1	14.2		11	5	48	63
Период на проследяване (месеци)	69.6	65	56	77	53	62
ACEi/ARB (%)	59.4	74	86	65	89	37
Имуносупресия (%)	38.4	29	46	30	31	32
Дефиниция на прогресия	Удвояване на S Cr	50 % ↓ eГФР или ХБЗ V	50 % ↓ eГФР или ХБЗ V	Удвояване на S Cr или ХБЗ V	50 % ↓ eГФР ил ХБЗ V	ХБЗ V
Прогресия (%)	18.4	22	16	20	15.5	12

Едва при 7 пациенти (5,6%) болестта се проявява с високостепенна протеинурия над 3,5г/24часа, като при 4 от тях се достига до терминален стадий бъбречна недостатъчност в рамките на 3 години, при двама - в рамките на 5. Само при 1 от болните, с високостепенна протеинурия, не се наблюдава прогресия на болестта, а стабилна бъбречна функция – стадий ХБЗ II по KDIGO в рамките на 7 годишно проследяване. В литературата процентът сред болните с ИгАН, при които болестта се проявява с нефрозна протеинурия, варира между 5 и 20%, като категорично това се счита за лош прогностичен белег.[194] Въпреки че броят на проследените от нас болни с високостепенна протеинурия е малък, ясно се вижда лошият клиничен ход и прогресията до терминален стадий на ХБЗ сред тази група от пациенти.

На този етап диагнозата ИгАН може да бъде поставена само след провеждането на ПББ. Заболяването може да доведе до всяка една от гломерулните увреди, типични за пролиферативните гломерулонефрити, наблюдавани на светлинна микроскопия. В ранните стадий на болестта може дори да няма промяна в структурата на гломерула. Най-често се среща огнищна (засягаща по-малко от 50% от гломерулите) или дифузна (>50% от гломерулите) мезангиална пролиферация, както и увеличаване на мезангиалния матрикс. В някои случаи лезиите се характеризират не само с промени в областта на мезангиума, но може да се наблюдава ендотелна пролиферация или левкоцитна инфилтрация, водещо до нарушаване на целостта на капилярния лумен и/или неговата облитерация. С времето тези възпалителни процеси в гломерула водят до огнищна гломерулна склероза, която не може да бъде разграничена от първичната форма на ОСГС, освен след провеждането на имунофлуоресцентно изследване. При пациентите с най-тежка форма на ИгАН, от хистологичното изследване, се наблюдава формирането на полулуния поради обширното разрушаване на капилярните бримки. Напредналите хронични лезии се характеризират с гломерулна склероза, белези за тубулна атрофия, интерстициална фиброза. Дали хистологичните промени дават възможност да се оцени риска от прогресия на болестта се изследва от много години. Ето защо в литературата могат да се срещнат различни хистологични класификации: класификация на Lee, класификация на Haas и други. На този етап е прието светлинно микроскопските промени, наблюдавани при ИгАН, да се оценяват по „Класификация на Oxford – MEST-C“ скалата за оценка на ИгАН. При всички пациенти, включени в този научен анализ, ПББ е проведена в клиниката, а материалът първоначално е класифициран по Hass. С оглед всички световни препоръки, както и приемането на класификацията по Oxford – MEST-C за златен стандарт от 2009 година, при разглеждането на биопсия с резултат ИгАН, всички резултати са прекласифицирани и по двата способа. Според класификацията по Haas, най-голям е делът на пациентите с хистологичен резултат – огнищно-сегментен склеротичен гломерулонефрит, 44 (35,2%). Причината за това е именно напредналия стадий на ХБЗ, при голяма част от пациентите, описан по-горе, данни за намалена еГФР. На второ място се подрежда -– дифузен пролиферативен гломерулонефрит, наблюдаван при 30 (24%), след което 28 (22,4%) – огнищно-сегментен пролиферативен гломерулонефрит. При 19 (15,2%) от пациентите е установен ИгАН - с минимални хистологични промени. Именно тези болни имат най-добър клиничен ход, тъй като степента на протеинурия е ниска, бъбречната функция е запазена и са подходящи за симптоматична терапия. Очаквано най-нисък е делът на

болните с хистологичен резултат – напреднал склеротичен гломерулонефрит 4 (3,2%). Нашите резултати от анализа на материала от ПББ класифицирани по Oxford-MEST-C е сравнен с тези, описани в литературата от големи проучвания сред пациенти с ИгА е Европа и Азия, Таблица 5-1. Вижда се, че има както сходство, така и разлики, естествено отново базиращи се на забавянето от поставянето на диагнозата и първите клинични прояви. Факт, който обяснява по-високия процент на тубулни лезии и склеротични промени в нашата кохорта, както и по-малкия брой на активни лезии – типичната мезангиална пролиферация и/или ендотелна пролиферация. Както стана ясно светлинно-микроскопските лезии при ИгАН не са специфични, могат да бъдат наблюдавани и при други гломерулонефрити, нямат строг патогномоничен белег. Ето защо, за да поставим диагнозата ИгАН е ЗАДЪЛЖИТЕЛНО провеждането на имунофлуоресцентна микрокопия. Имунофлуоресцентното изследване дава положително предимно и доминиращо оцветяване за ИгА, сравнено с ИгГ и ИгМ. Отлаганията са предимно в мезангиума, въпреки че в някои от случаите, предимно по-тежките, може да се наблюдава и светене в областта на капилярите. Винаги ИгА доминира, но може да се наблюдава и отлагане на ИгМ и ИгГ. Ние наблюдаваме отлагане на ИгМ и/или ИгГ при 30 (24,8%) пациенти. Трябва да се обърне внимание и на високия процент на отлагане на С3 в мезангиума 109 (90,8%) , което потвърждава участието на системата на комплемента в патофизиологичните механизми на болестта. Такива данни се разкриват и от други автори, които свързват степента на отлагане и като прогностичен фактор за по-тежко протичане на болестта. Нашите данни установяват корелация между отлагането на С3 и прогресията на болестта (p=0,05).

Преследвана утопия, през последните години, е желанието да се даде ясна прогноза на болестта, още при поставяне на диагнозата с провеждането на ПББ. Това се илюстрира с редица клинични проучвания, имащи за цел оценката на параметри, влияещи върху клиничния ход на болестта. Това води до използването и на калкулатори за оценка на риска - https://qxmd.com/calculate/calculator_499/international-igan-prediction-tool-at-biopsy-adults. В следващия абзац ще разгледаме оценените от нас фактори върху прогресия на ИгАН. Знаем, че дългогодишната артериална хипертония е самостоятелен рисков фактор за бъбречна увреда. В настоящия научен труд изследвахме връзката между анамнезата за незадоволителен контрол на артериалното налягане при пациенти с ИгА, както и установената такава, и връзката с хистологичните промени. Такава зависимост не бе установена, най-вероятно поради фактът, че промените в съдовете не

са включени в двете класификации - по Haas и Oxford. Допълнителен анализ установи корелационна зависимост между наличието на артериална хипертония и описаните хистологични промените в артериолите. Тези данни поставят въпроса за бъдещи дискусии, дали не трябва да се добавят и съдовите промени, като самостоятелен фактор към MEST-C, оценяващ прогресията на болестта. Серумният креатинин и изчислената еГФР са най-широко използвания показател за оценка на бъбречната функция. Проведеният корелационен анализ показва, че пациентите с повишени стойности на серумния креатинин имат повече склеротични гломерули. Установява се и връзка между повишените стойности на серумния креатинин и ехографските данни за напреднал дифузен бъбречен процес. Тези данни за очаквани и описани в литературата, но потвърдени и от нас.

Прогресията, в степента на бъбречна увреда сред пациентите с ИгАН , варира значително сред различните популация и е огромно предизвикателство пред лекуващия. Изключително трудно е да се предвиди при кои пациенти се очаква влошаване на ХБЗ, както и колко бързо това ще настъпи. Посочваме три примера, които илюстрират това. Норвежкият регистър за бъбречно биопсирани представя данните от проследяването на 145 пациентите с ИгАН, протеинурия <1 г/ 24 часа и еГФР>60мл/мин при поставяне на диагнозата, а средно болните са проследени за период от 22 години. При 19% се установява ≥ 50% намаляване на еГФР, като при 4 - ХБЗ – терминален стадий (1). При 29% се установява клинична ремисия (еГФР ≥60мл/мин, без данни за хематурия и микроалбуминурия, артериално налягане <140/90). Проучването не установява маркер, които да установи рискът от прогресия. Второто проучване е от Испания, включващо 141 пациенти, при които се установява нискостепенна протеинурия при изявата на болестта, като само при 3,5% от пациентите се установява >50% увеличаване на стойностите на серумния креатинин. Болните са проследени са среден период от време 9 години и нито един не е достигнал до диализа. Третото проучване – VALIGA е с период на проследяване от 7 години, включва 1130 болни, от 14 европейски държави, със средна стойност на протеинурията 1,2г/241аса и еГФР74мл/мин (22). Данните сочат, че при ¼ от пациентите се достига до терминален стадий на хронична бъбречна увреда или до 50% намаляване на еГФР. Големите различия между тези три проучвания подчертават колко важно е да се установят пациентите в риск от прогресия, както и да бъдат лекувани правилно. Потвърден е голям брой от клинични и хистологични данни за определяне риска от прогресия, при поставяне на диагнозата, но не е изследвана връзката им в

насока избор от лечение. На този етап не съществува валидиран прогностичен серумен или уринен биомаркер, освен еГФР и протеинурията. Нашите данни сочен, че серумният креатинин корелира с по-висока честота на склеротични промени, а по-високата степен на протеинурия с напредналите склеротични промени и наличието на полулуния. Установена е връзката между хипертонията (10), напредналата възраст, затлъстяването, дислипидемията с лошата прогноза на болестта, но те не са директно свързани с хистологичните промени, както и не са свързани с риска от намаляване на бъбречната функция. На този етап единствените маркери, които могат да бъдат използвани за оценка на прогресията на ИгАН, са еГФР и протеинурията (20). Трябва да се отбележи, че дори персистираща нискостепенна протеинурия (между >0.5 и <1.0г/24часа) може да се асоциира с прогресия. Това ясно се демонстрира от двете големи проучвания UK RaDaR IgA и VALIGA. Друго изследване, имащо потенциал да оцени прогнозата при ИгАН, е именно наличието на хематурия. Интересен факт е, че макроскопската хематурия се асоциира с по-нисък риск от прогресия на болестта, но тези данни могат да се дължат на фактът, че това е по-честа изява на болестта при деца, а при възрастни е симптом, които поради уплахата, „водят“ пациентът на преглед. Тук трябва да се обърне внимание, че рецидивиращата макроскоспка хематурия е лош прогностичен признак. Нашите данни потвърждават това твърдение, с установяването на корелационна зависимост между установени епизоди на макроскопска хематурия и прогресия на болестта.

Полът също може да влияе на прогресията на болестта. Някои проучвания показват кратък период до достигане на краен стадий бъбречна увреда и/или удвояване на стойностите на серумния креатинин сред мъжкия пол. В проучване на Hwang et al. (2013) се установяват по-високи нива на протеинурия и по-бърз темп на намаляване на еГФР сред мъжете. Това може да се дължи на различията в имунния отговор и възпалителните процеси между двата пола, както и на различни хормонални влияния. Нашите резултати не установяват зависимост между полът и прогресията на болестта.

Основен акцент на настоящия научен труд е изследването на биомаркери при ИгАН. Както беше подчертано, в основата на патогенезата на ИгАН е именно наличието на Гд-ИгА1, както и образуването на циркулиращи имунни комплекси и тяхното отлагане в бъбречния мезангиум. Ето защо настоящото проучване изследва серумни нива на Гд-ИгА1, ИгА, С3, , Гд-ИгА1/ИгА, ИгА/С3, BAFF и APRIL, според съответните специфичните методи, подробно описани в секция - „материали и методи“. Серумните нива на имуноглобулин А, галактозо-дефицитните ИгА1 и съотношението ИгА/С3 са

обещаващи маркери за неинвазивна диагностика и прогноза на клиничния ход на болестта. Смята се, че Гд-ИгА1 са в основата на патогенезата на болестта и ключ към специфична терапия, което е и причина за големия научен интерес в изследването им. Получените резултати показват сигнификантно по-високи стойности на серумните нива на Гд-ИгА1, ИгА, ИгА/С3, Гд-ИгА/ИгА сред пациентите с ИгАН сравнено със здрави контроли. Тези данни са описани в литературата [195,196], но се потвърждават за първи път и сред българската популация. Трябва да се отбележи, че въпреки установените статистически значими разлики за четири от посочени пет изследвани маркера, проведения допълнителен ROC анализ на данните показва AUROC крива над 0.7 единствено за Гд-ИгА1. Това заключва висока диагностична достоверност единствено за серумните нива на Гд-ИгА1, като точността на метода варира в различните проучвания. Нашите данни сочат чувствителност 80%, специфичност 66%. В настоящото изследване представяме данни от проучване, насочено към определяне и на диагностичната стойност на ИгА и ИгА/С3, за първи път сред българската популация. Установихме, че серумната концентрация на ИгА и съотношението ИгА/С3 имат място в диагнозата на ИгАН, но получената чувствителност и специфичност на метода е далеч от търсенето на биомаркер, надежден да замени ПББ при ИгАН. Получените от нас резултати, относно диагностичната стойност на серумната концентрация на ИгА, се потвърждава и от други автори. Atsuko Maeda et al[197] установяват, че микроскопската хематурия, протеинурията и серумните нива на ИгА, както и съотношението на ИгА/С3 са полезни за разграничаването на ИгАН от други първични бъбречни заболявания. Moldoveanu et al.[195] установяват, че серумните концентрации на ИгА са завишени при около половината от изследваните от тях пациенти, но не откриват задоволителен резултат относно диагностичната стойности на този биомаркер. Получените данни относно серумната концентрация на ИгА, като маркер на болестта, са близки до тези описани в литературата, но също така потвърждават необходимостта от допълнителни многоцентрови проучвания, както и продължаването на търсенето на други по-специфични биомаркери, с по-висока чувствителност. Още през 2000г. Yasuhiko et al установява, че серумните нива на ИгА/С3 съотношението може да бъде използвано както за поставяне на диагнозата ИгАН, но също така има и място в прогнозата на болестта.[179] Wen-yu Gong предоставят ясни доказателства, че съотношението ИгА/С3 е валиден диагностичен и прогностичен маркер за диагнозата ИгАН, особено при пациенти с протеинурия по-малко от 1г/ден, но също така потвърждават и нуждата от допълнителни проучвания в тази насока.[198] Относно ИгА/С3 нашите данни сочат

незадоволителност на метода, с по-ниска чувствителност и специфичност от описаната в литературата, най-вероятно поради малкият брой на участниците в изследването.

Разлика в серумните нива на C3 между двете изследвани групи не се установява, което се потвърждава и от други автори. [199,200]

Ключови медиатори в продукцията на Гд-ИгА1, както и стимули за синтеза на автоантитела насочени към Гд-ИгА1, са BAFF и APRIL, като всеки един от тях има изключително важна роля върху преживяемостта и активирането на В клетката, съответно и върху хуморалния имунитет. Голям брой предклинични и клинични проучвания подчертават ключовата роля на BAFF и APRIL в активирането на В клетката, както и последващата продукция на Гд-ИгА1 от ИгА+-В секретиращата плазма клетка. Завишени серумни нива на BAFF и APRIL са наблюдавани сред пациенти с ИгАН, както и корелация между тежестта на болестта и тяхната серумна концентрация. На тези данни се базират и изключително големия брой на клинични проучвания с медикаменти целящи инхибията на BAFF и APRIL. Нашите данни не установяват завишени серумни нива на BAFF и APRIL сред пациентите с ИгАН, сравнено със здрави контроли.

Освен диагностичната роля на посочените биомаркери, настоящият научен труд цели да оцени и тяхната прогностична. Със средна продължителност на проследяване на пациентите от 69 месеца, както и оценка на бъбречната им функция на базата на eGFR и класифициране на стадия на ХБЗ по KDIGO, болните се разпределиха в две групи – „прогресори“/“непрогресори“. Посочените резултати не установяват разлика в серумните нива на нито един от биомаркерите между двете групи. Нашите данни заключват, че Гд-ИгА1, ИгА, C3, ИгА/C3 не са достатъчно надеждни за оценка на прогностичния хода на болестта. Проучвания като тези на Rizk et al. (2019) също не намират силна прогностична стойност за Гд-ИгА1, въпреки че други изследвания предполагат обратното. Тези противоречиви резултати подчертават необходимостта от допълнителни изследвания, за да се уточни ролята на тези биомаркери не само в диагностиката, но и в прогнозирането на хода на заболяването.

Друг основен въпрос, които се разглежда в настоящия научен труд, е оценка на прилаганите терапевтични режими. Значителен брой проучвания подкрепят използването на ACE инхибитори и ARB като първа линия на лечение за пациенти с ИгАН. Настоящият стандарт за лечение на пациентите с ИгАН, с протеинурия над

0,5г/дневно включва блокада на ренин-ангиотензиновата система (РАС) с инхибитор на ангиотензин-конвертиращия ензим (АСЕ инхибитор) и/или с ангиотензин рецепторен блокер (АРБ), независимо от това дали пациентът има клинични данни за хипертония.[201] Проучването на Praga et al. (2003) показва, че лечението с тези медикаменти води до значително намаляване на протеинурията и забавяне на прогресията при ИгАН. Това предполага, че тези медикаменти могат да бъдат ефективни при специфични подгрупи от пациенти, но също така подчертава необходимостта от индивидуален подход към терапията. Едва ли може да се дискутират терапевтични схеми при ИгАН и да не спомена клиничното проучване STOP-IgAN[202]. Резултатите описани в STOP-IgAN категорично подчертават плюсовете от прилагането на поддържаща терапия, включваща ACEi/ARB, както и предимствата им над имуносупресивната. Около 1/3 от пациентите с ИгАН, при които е променен диетичния режим, преустановено е тютюнопушенето, проведена е корекция на телесните килограми, се достига до спад на протеинурията, така че болните вече не отговарят на заложените препоръки за лечение с имуносупресивен медикамент (протеинурия над 1г/дневно). Настоящото проучване установява статистически значима ползва в забавяне прогресията на ИгАН сред пациентите, при които е проведена терапия единствено с ACEi и ARB. Сходни резултати са представени и от Barratt et al.[203] Трябва да подчертаем, че положителните резултати от лечението с ACEi и ARB са на фона на продължителен прием на медикаментите, в максимално поносима доза, със стриктно проследяване на лабораторните показатели, както и преценка риска от развитието на хиперкалиемия.

Употребата на кортикостероид при лечението на ИгАН е противоречиво, като има много неясноти, относно оптималната доза, продължителността, както и при кои пациенти. Настоящите препоръки за добра клинична практика от KDIGO предлагат пациентите с ИгАН и протеинурия над 1г/дневно, след проведено 90 дневно лечение с поддържаща терапия, да бъде обсъдено добавянето на кортикостероид към лечението, но само след подробно разглеждане на ползва/риск. Клиничното проучване - The Therapeutic Effects of Steroids in IgA Nephropathy (TESTING), демонстрира полза от лечението с кортикостероид (за период от 6-9 месеца) при пациенти с ИгАН сравнено с плацебо.[128] Резултатите отчитат забавяне в прогресията на болестта, намаляване честотата до терминален стадий бъбречна недостатъчност, както и редукция на честотата на смърт поради бъбречно заболяване. Ние отчитаме забавяне в прогресията на болестта в групата

от пациенти с ИгА, при които е приложена комбинация от кортикостероид и АСЕ/АРБ. Тези данни са в асоциация с терапевтичните схеми описани в това емблематично клинично проучване за ИгАН - TESTING. Pozzi et al. също демонстрират добри резултати от кортикостероидната терапия, при пациенти с високостепенна протеинурия и ИгАН.[204] Въпреки това, дългосрочната употреба носи значителни рискове от странични ефекти, включително стероиден диабет, хипертония, остеопороза, инфекции. Категорично трябва да спомена и установените странични ефекти от проведеното кортикостероидното лечение при пациентите с ИгАН в клиничното проучване TESTING , което демонстрира явен проблем при продължителната употреба на тези медикаменти.[205–207] Ето защо продължава да се търсят по-ефективни терапевтични режими. Настоящото проучване подчертава колко сложен е проблема в избора на терапевтичен подход сред болните с ИгА, както и необходимостта от индивидуална стратегия, съобразена със специфичните нужди на всеки пациенти.

Според някои клинични проучвания, комбинираната терапия кортикостероиди и циклофосфамид показва обещаващи резултати, особено при пациенти с висок риск от прогресия до краен стадий на хронично бъбречно заболяване, при установени полулуния от ПББ, както и наличието на високостепенна протеинурия. [130,131] Клиничните проучвания в Китай потвърждават, че ИгА нефропатията с полулуния се асоциира с лоша прогноза. В проучване, включващо 113 пациенти от осем центъра в Китай, няма значителна разлика в скоростта на прогресия до терминален стадий на ХБЗ между групата, получавала имуносупресивна терапия (комбинирана КС + циклофосфамид), и групата без такова лечение. [132] Установява се обаче, че имуносупресивната терапия намалява риска за развитието на ХБЗ – 5ти терминален стадий при пациентите с полулуния (клетъчни или клетъчно-фиброзни > 50%).[132] Насшите данни сочат най-висок процент на прогресия до термианлен стадий ХБЗ именно в групата от пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с КС и циклофосфамид. Тук трябва да подчертаем обаче, че именно тази комбинация е използвана поради хистологичните данни за активност, наличие на полулуния и/или липсата на ефект от лечение само с КС, както и персистирането на високостепенна протеинурия. Последните насоки на KDIGO - 2021 г. за употребата на циклофосфамид при лечението на ИгАН гласят, че не се препоръчва, освен при бързо прогресиращ ИгАН.

След резултатите, демонстрирани от клиничните проучвания The Dapagliflozin and Prevention of Adverse Outcomes in Chronic Kidney Disease (DAPA-CKD) и EMPA-

KIDNEY, натриево-глюкозен контранспортер-2 (SGLT2) инхибиторите излизат на преден план като потенциален терапевтичен вариант.[208–210] Настоящото клинично проучване не разглежда лечението с SGLT2, тъй като проследяването на пациентите обхваща период преди публикуването на резултатите от посочените по-горе клиничните проучвания. Лечението на ИгАН с SGLT2 е заложено като приоритет на бъдещи научни изследвания сред нашите пациенти.

6 Изводи

1. По-високата честота на ИгАН сред мъжкия пол и ниска средна възраст на изява.
2. Основните клинични прояви на ИгАН включват хематурия, артериална хипертония и умерена протеинурия.
3. Честите гърлени инфекции са предшестващ фактор за епизод на хематурия.
4. Фактори влияещи прогресията на болестта са: степента на протеинурия и степнета на ХБЗ при поставяне на диагнозата.
5. Галактозо-дефицитните-ИгА1 е нов диагностичен биомаркер при ИгАН
6. Съвременната хистологична верификация на ИгАН задължително трябва да е по MEST-C скор системата.
7. Използването на АСЕ/АРБ сред пациенти с ИгА има категоричен положителен ефект в/у всички пациенти с ИгА
8. Режимът - АСЕ/АРБ + кортикостероид при пациенти с ИгАН с клинично и хистологично данни за активност на болестта (протеинурия над 1г/24часа) има най-добър терапевтичен ефект, сравнено с останалите имуносупресивни режими
9. Процентът на прогресията на хроничната ИгА нефропатия е 18,4%, при адекватен диагностично-терапевтичен план
10. Категорична е необходимостта от търсенето на нови терапевтични схеми, индивидуален подход, за да се подобрят клиничните резултатите и качеството на живот на пациенти.

7 Приноси

- Първият в България задълбочен труд за ИгА нефропатия от 34 години.
- Научният труд предоставя цялостен анализ на клиничните и лабораторните характеристики на IgA нефропатията, предоставя ценни епидемиологични данни, които могат да подобрят разбирането на клиничния ход и прогресията сред българската популация.
- Установява темпа на прогресия сред българската популация
- Оценява диагностичната стойност на серумните нива на Gd-IgA1
- Идентифицира повишени нива на IgA, Gd-IgA1/IgA и IgA/C3 при пациенти с IgAN, като потенциален биомаркер
- Изследването фрагментирано оценява мястото и ефективността на прилаганите до момент терапевтични режими и подчертава необходимостта от нови.

8 Препоръки

- Редовен мониторинг и проследяване на всички пациентите с ИгАН с цел забавяне на прогресията на болестта и корекция на всички рискови фактори.
- Доброто познаване и прилагане на терапевтичните режими на KDIGO според активността на ИгА нефропатията, не трябва да изключва индивидуална клинична и терапевтична оценка на всеки отделен случай.
- Необходимо е търсенето на нови терапевтични схеми с оглед високия процент на прогресия, както и липсата на специфична терапия.
- Трябва да се насърчава търсенето на нови биомаркери и внедряването им в практиката

9 Публикации и участия в научни прояви

Публикации:

1. “IgA nephropathy beyond the standart” - „ИгА – нефрит – поглед зад стандарта“ – Ива Костадинова, Мила Любомирова, Борис Богов – списание „Нефрология, диализа и трансплантация“
2. „Clinical and Epidemiological Study of IgA Nephropathy in the Bulgarian population: Insight into Disease Presentation and potential Biomarkers“ -Iva Kostadinova, Mila Lubomirova, Boris Bogov, Ekaterina Kurteva, Dobroslav Kurkchiev, Todor Todorov - Journal of Personalized Medicine, **IF 3.4**
3. Диагностична роля на ИгА и ИгА/С3 при пациенти с ИгА нефропатия – И. Костадинова, М.Любомирова, Б. Богов, Е.Куртева, Д.Кюркчиев, Т.Тодоров, Списание „Нефрология, диализа и трансплантация“

Участия в национални и международни форуми:

1. Национална конференция по нефрология, 2018г. – ИгА нефропатия – настоящ опит и бъдещи перспективи
2. Национална конференция по нефрология, 2021г. – ИгА нефропатия. Нови биомаркери
3. Световен конгрес по нефрология, Банкок, Тайланд, 2023г. – Evaluation of novel biomarkers for IgA nephropathy in the Bulgarian population, **IF 7.1**
4. Световен конгрес по нефрология, Буенос Айрес, Аржентина, 2024г. – Treatment modalities and disease progression in IgA nephropathy: A ten-year retrospective analysis in Bulgaria, **IF 7.1**
5. Европейски конгрес по нефрология, Стокхолм, Швеция, 2024г. - Exploring BAFF, APRIL, and Clinical Characteristics in IgA Nephropathy: A Decade-Long Study in the Bulgarian Population

Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд:

1. ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКА ПРОГРАМА към Медицински факултет, МУ-София, Конкурс „Млади ученени и постдокторанти“ – ГД-37/24.03.2020г., тема „Нови биомаркери при ИгА гломерулоенфрит“

2. ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ по програма за подпомагане на млади лекари към БЛС по проект “Нови биомаркери при IGA гломерулонефрит”, договор №10/04.11.2019 година.