

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Д-р Росен Димитров Михайлов

ДИСЕРТАЦИЯ

София 2014

СЪДЪРЖАНИЕ

1	УВОД	6
2	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
2.1	БИОМАРКЕРИ	8
2.2	БЪБРЕЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ	11
2.2.1	<i>Общи данни</i>	11
2.2.2	<i>Разпространение</i>	12
2.2.3	<i>Причини</i>	14
2.2.4	<i>Лабораторни показатели</i>	15
2.3	БИОМАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА НА ГФ.....	16
2.3.1	<i>Креатинин</i>	16
2.3.2	<i>Цистатин С</i>	18
2.3.3	<i>Методи за определяне на креатинин и цистатин С</i>	22
2.4	ГЛОМЕРУЛНА ФИЛТРАЦИЯ (ГФ, GFR)	38
2.4.1	<i>Екзогенни маркери за гломерулна филтрация</i>	41
2.4.2	<i>Ендогенни маркери за гломерулна филтрация</i>	42
2.4.3	<i>Формули за изчисление на ГФ</i>	44
2.4.4	<i>Референтни граници на ГФ</i>	53
2.4.5	<i>Нова класификация на ХБЗ съгласно препоръките на NKF и KDOQI от 2012-2013 г.</i>	57
2.4.6	<i>Сравнение на цистатин С с креатинина за оценка на ГФ</i>	59
2.5	БИОМАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА НА УВРЕЖДАНЕТО НА БЪБРЕЦИТЕ.....	62
2.5.1	<i>Общи данни</i>	62
2.5.2	<i>Протеинурия</i>	63
2.5.3	<i>Албуминурия</i>	70
2.5.4	<i>Съотношение албумин/креатинин (ACR)</i>	73
3	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	81
3.1	ЦЕЛ	81
3.2	ЗАДАЧИ	81
4	МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	83
4.1	АНКЕТЕН МЕТОД	83
4.2	КЛИНИЧЕН МЕТОД	83
4.3	ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	83
4.3.1	<i>Определяне на цистатин С</i>	83
4.3.2	<i>Определяне на албумина в урината</i>	85

4.3.3	<i>Определяне на общия белтък в урината</i>	86
4.3.4	<i>Определяне на останалите лабораторни показатели</i>	86
4.3.5	<i>Определяне на гломерулната филтрация</i>	87
4.4	СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ	88
5	РЕЗУЛТАТИ	91
5.1	РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ	91
5.2	РЕЗУЛТАТИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ	99
5.2.1	<i>Контроли (клинично здрави лица)</i>	99
5.2.2	<i>Диабетици</i>	105
5.2.3	<i>Хипертоници</i>	118
5.2.4	<i>Диабетици с хипертония</i>	128
5.2.5	<i>Хронични първични бъбречни заболявания (ХПБЗ)</i>	138
5.2.6	<i>Сравнителен анализ на отделните групи</i>	147
6	ОБСЪЖДАНЕ	156
7	ИЗВОДИ	193
8	ЛИТЕРАТУРА	195

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

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

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

1 УВОД

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

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

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

За да се приеме един показател за биомаркер, той трябва да отговаря на строго определени критерии. Най-често използваните екзогенни маркери от радиоизотопните са $^{51}\text{Cr-EDTA}$ $^{99\text{mTc-diethylenetriamine-pentaacetic acid}}$ и $^{125}\text{I-iothalamate}$, а от нерадиоизотопните - inulin и iohexol. Най- използваният ендогенен маркер от много години е креатининът. Освен многото предимства, креатининът има и недостатъци. Чрез него може да се надцени или подцени стойността на гломерулната филтрация. Затова през последното десетилетие се предлага един нов алтернативен биомаркер - цистатин С. Той е белтък, член на

суперфамилията цистатини. Произвежда се от всички ядреноносни клетки в човешкото тяло. Концентрацията му в кръвта на даден индивид е доста постоянна. Филтрира се през гломерулите и се реабсорбира в проксималните тубули, без да се екскретира с урината. Затова теоретично се приема за почти идеален биомаркер за оценка на гломерулната филтрация. Получените данни за него са все още непълни, а в отделни случаи – и противоречиви, особено що се отнася до влиянието на пол, възраст, тегло, тютюнопушене и раса върху референтните стойности. Използването на цистатин С самостоятелно или в комбинация с креатинина за оценка на гломерулната филтрация в момента е обект на много проучвания. У нас изследването на цистатина при бъбречно болни, диабетици, хипертоници и други е в своето начало и ние ще се опитаме да оценим ролята му в диагностиката главно на хроничните бъбречни заболявания.

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

2 ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1 Биомаркери

Биомаркерите (БМ) са специфични молекули, клетки, гени, генни продукти, ензими или хормони. Класическият биомаркер в медицината е лабораторен параметър, който се използва за да помогне при вземане на решение относно прогнозата, диагнозата и терапията на дадено заболяване. Биомаркерите се определят, като "клетъчни, биохимични или молекулни промени, които се измерват в биологичните среди - кръв, урина, ликвор". Биомаркерите осигуряват динамичен и мощен подход към разбиране спектъра на заболяванията с приложение за скрининг, диагноза и прогноза (9, 54, 66, 94, 152, 214). Те предлагат средствата за класификация на заболяванията и рисковите фактори (фиг. 1) и разширяват информацията относно патогенезата на заболяванията. Биомаркерът може да отразява целия ход на заболяването от най-ранните прояви до крайните етапи. Те улесняват разбирането за прогноза, причина, диагностика, прогресия, регресия или резултат от лечение.

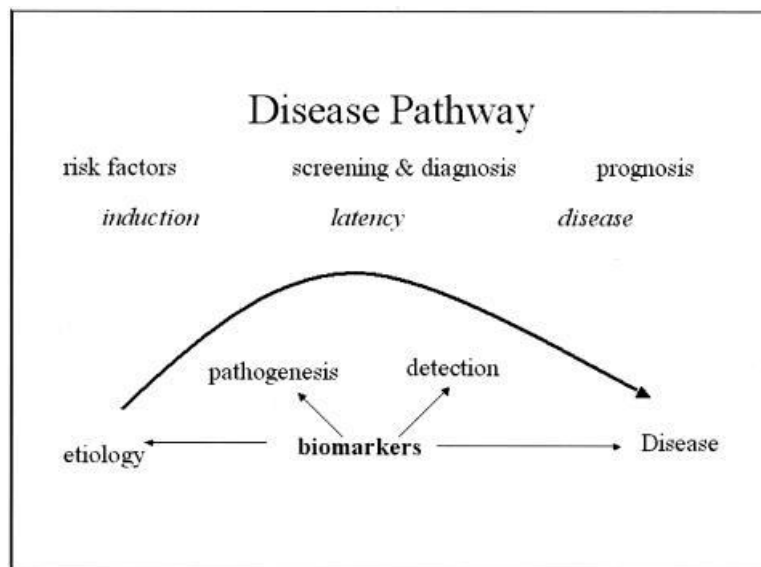
Биомаркерите се използват в диагностицирането на редица заболявания, включително бъбречните. Те осигуряват информация за прогресия на заболяването, прогнозата и отговорът към лечението на бъбречно болните.

Както се вижда от фигурата, биомаркерите са активни участници в разкриване на етиологията, патогенезата, прогнозата на заболяването. Съществуват различни класификации на биомаркерите. Според една от класификациите те са:

а/ За оценка на риска от заболяване;

б/ За диагностика и проследяване на прогресията на заболяването.

Според друга класификация биомаркерите се разделят на а/ диагностични и б/ прогностични.



Фигура 1: Схематично представяне на биомаркерите и влиянието им за развитието на дадено заболяване (214).

Някои биомаркери са директно, а други индиректно свързани със съответното заболяване (66, 214). Те се изследват най-често в кръв, урина или ликвор за установяване на "предклиничен" етап, латентен ход или изявено заболяване. В допълнение към вече известни параметри, като тези от кръвната картина има много нови биомаркери. В момента се провежда интензивна работа за откриване и разработване на иновативни и по-ефективни биомаркери. Тези нови биомаркери са се превърнали в основа за превантивната медицина. Биомаркерите се разглеждат и като ключ към персонализираната медицина. Те се ориентират към индивидуалното лечение на определени пациенти, за високоефективна намеса в болестни процеси. Често такива биомаркери показват промени в метаболитните процеси. Надеждността, валидността, чувствителността и специфичността на биомаркерите са много важни за правилната оценка. Идентифицирането на пациента, точният анализ на съответния показател, индивидуалните му качества и правилното интерпретиране на резултатите са друг съществен елемент.

Понятието биомаркер е сравнително ново, с история по-къса от две десетилетия. Реално обаче биомаркери се използват от дълги години.

Пример за това например е протеинурията като маркер за функцията на бъбреците. Търсенето на достатъчно специфични, чувствителни и подходящи за рутинно приложение биомаркери за бъбречните заболявания продължава повече от един век. Засега се предлагат следните биомаркери съгласно патофизиологичната увреда на бъбреците (54, 66):

Таблица 1: Класифициране на биомаркерите съгласно механизмите, които отразяват (модифицирана по 54)

Процес	Биомаркер
1. Бъбречна функция (ГФ)	1. Цистатин С 2. ВТР
2. Тубуло-интестинална увреда	1. NGAL 2. KIM 1 3. NAG 4. L-FABP
3. Гломерулна увреда	1. Албумин, Продокин 2. Нефрин
4. Ендотелна дисфункция	1. ADMA

От посочените биомаркери NGAL е най-подходящият биомаркер за установяване на прогресията на ХБЗ, а цистатин С е най-показателният биомаркер за бъбречната функция. Трудно е да се приеме, че само един маркер може да прогнозира прогресия на ХБЗ и сърдечно-съдовата заболеваемост и смъртност поради сложността на протичащите многобройни патофизиологични процеси (54, 214). Много по-надеждна е информацията, ако се използва панел от биомаркери. Въпреки развитието на протеомиката и различните методи използването на някои биомаркери е все още трудоемко и скъпо. Внедряването на нови биомаркери за ХБЗ е повече от необходимо. Причина за това е, че в световен мащаб и у нас се наблюдава тенденция за увеличение на бъбречните заболявания, респективно на хроничната бъбречна недостатъчност. Всичко това оправдава търсенето и използването на все по-нови и по-нови биомаркери, каквито са цистатин С и албуминурията.

2.2 Бъбречни заболявания

2.2.1 Общи данни

Бъбреците са основен екскреторен и хомеостатичен орган. Те имат три основни функции: а/ отстраняване на отпадните продукти от обмяната на веществата и на токсините попаднали в кръвта; б/ синтез на хормони, които контролират кръвното налягане и производството на червени кръвни клетки; в/ регулиране нивата на минерали, електролити и течности в организма. Така бъбреците регулират постоянството на вътрешната среда - рН, осмоларитет, нискомолекулни азотни вещества и т. н. Бъбречното заболяване води до неефективни функции - екскреторна, регулаторна (хомеостатична) и инкреторна (ендокринна) (3, 107, 111, 141, 186). Причините могат да бъдат предбъбречни, бъбречни и следбъбречни. Бъбречната недостатъчност може да се развие в резултат на първично заболяване на бъбреците (гломерулонефрит, пиелонефрит, калкулоза, съдови аномалии) и на вторично заболяване поради друго основно заболяване, което впоследствие засяга бъбреците (като диабет, хипертония, метаболитен синдром, обезитас и други) (107, 114). В зависимост от скоростта на прогресия бъбречната недостатъчност бива:

а/ **остра бъбречна увреда** (ОБУ, acute kidney injury, AKI) (17, 22, 117), която се развива за часове или дни и е съпроводена с бърз спад във функционирането на бъбреците. Основната ѝ характеристика е намален обем на кръв към бъбреците, независимо от причината. За диагнозата важно значение има увеличението на креатинина и уреята, олиго- и анурията. Освен това сега се предлагат и нови маркери, като NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), KIM-1 (kidney injury molecule 1), IL 6, IL18, цистатин С, D-димери и други (3, 4, 14, 66, 225);

б/ **хронично бъбречно заболяване** (ХБЗ, chronic kidney disease (CKD), или chronic renal disease (CRD)). ХБЗ е състояние на прогресивна загуба на бъбречната функция и увреждане в продължение на месеци или години (16, 40, 93, 114, 125, 131, 141, 165, 208). Поради много общи, неспецифични симптоми ХБЗ се диагностицира със закъснение. Диагнозата на ХБЗ се базира на лабораторни изследвания, изобразяващи

техники и бъбречна биопсия. Съгласно класификацията на NKF KDOQI (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) и на KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) (93) от 2002 г. ХБЗ протича в 5 стадия, като е редно да се говори за хронична бъбречна недостатъчност (ХБН, *insufficiencia renalis chronika* (IRC), *chronic kidney failure* СКФ) от третия стадий нататък. От март 2013 г. NKF KDOQI подразделят третия стадий на две подгрупи (92). Петият, последен етап, известен като терминална бъбречна недостатъчност (ТБН или *end stage renal disease*, ESRD) е много тежко заболяване, изискващо диализа или трансплантация.

В двата бъбрека има нормално около 2 милиона нефрона. За развитието на хронична бъбречна недостатъчност е необходимо редуциране на броя им, респективно - намаляване обема на функциониращия бъбречен паренхим с повече от 50-60%. Според последната класификация на NKF KDOQI (92) бъбречното заболяване се определя, като хронично, когато ГФ е $<60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, налице е албуминурия и заболяването трае по-дълго от 3 месеца, независимо от това дали е доказано наличие или липса на увреждане на бъбреците (82). Макар и рядко, може някои пациенти да имат ГФ над $>60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ въпреки бъбречното увреждане. Това е особено опасно, защото може да няма почти никакви симптоми, докато не настъпи значително, често непоправимо увреждане на бъбреците. Често то се открива при скрининг на хора с риск от бъбречни проблеми, като тези с диабет, високо кръвно налягане, фамилна обремененост и други. В характеристиката на ХБЗ има две основни следствия – прогресивна загуба на бъбречна функция с времето и развитие на сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) с висока смъртност (12, 16, 35, 64, 127, 131, 189, 208).

2.2.2 Разпространение

Хроничното бъбречно заболяване е сред водещите по честота хронични заболявания, предизвикващи инвалидизация или трайно и съществено понижение на качеството на живот. То се среща по целия свят със слабо изразена географска предилекция. Честотата на ХБЗ е почти 10-13% с тенденция за увеличаване в почти всички страни (36, 117, 196, 208,

210). В света от ХБЗ страдат над 50 милиона души или близо 10% от човечеството. Според NKF с хронична бъбречна недостатъчност понастоящем е 11% от населението на САЩ, като при възрастните над 50 г. болните са около 16,8% (35, 93, 131, 132). В Европа честотата е в границите на 6% – 8% - 10% - 13% и е различна в различните страни: в Португалия - 6,8%, в Норвегия – 10,2%, Австрия - 8,6%, в Англия - 7,2%. Пациентите, нуждаещи се от диализа, са между 90 и 170 на милион население в Европа, а в САЩ - 340 души на 1 млн. население (35). За период от 15 г. в САЩ броят на хората с ХБН над 60-годишна възраст се е увеличил от 18,8% на 24,5% (40, 45, 46, 49, 145, 154). У нас ХБЗ засяга пряко почти 13% от населението (12,8%). Засегнат е всеки осми българин. Около 9000 са пациентите с хронична бъбречна недостатъчност. При около 2/3 от случаите причина за ХБЗ са диабетът и хипертонията и само в 1/3 ХБЗ е първично заболяване на самите бъбреци.

Захарният диабет според някои изследователи е причина за ХБЗ в 38%, а други отчитат, че той е причина за заболяването в 53% от случаите (64, 70). Артериалната хипертония според някои води до ХБЗ в 28%, а според други - в 45% от случаите. Болните от хипертония и диабет непрекъснато се увеличават и това води след себе си до увеличаването на страдащите от ХБЗ. У нас 300 000 са болни от захарен диабет, а над 1 милион - от артериална хипертония. Почти 750 хиляди българи имат лека форма на **хронично бъбречно заболяване**. Честотата на смърт от сърдечно заболяване е средно около 3 пъти по-голяма при хората с бъбречно заболяване, отколкото при хора на същата възраст и от същия пол, които имат здрави бъбреци. При напреднала хронична бъбречна недостатъчност този риск е над 6 пъти по-висок в сравнение с хората с нормална бъбречна функция. Хората със сърдечно заболяване и намалена бъбречна функция са с около 50% повишен риск от смърт в сравнение с тези с нормална бъбречна функция (16, 47, 116, 145). В света всяка година се появяват над 250 000 нови болни. В България понастоящем на диализа

са над 2500 болни с хронична бъбречна недостатъчност. Прогнозите сочат, че в близко бъдеще броят на тези болни ще се увеличи рязко поради непрекъснатото увеличаване на болните от захарен диабет тип 2 и от хипертония (125, 129, 214). В света понастоящем има 154 милиона болни от диабет, като се очаква броят им да нарасне до 360 милиона през 2030 година. Поне 40% от тях ще развият бъбречно заболяване и свързания с това сърдечно-съдов риск. Над 10% ще достигнат терминален стадий на бъбречна недостатъчност. Ранните симптоми на ХБН са неспецифични и това забавя диагнозата с месеци и години. Диагнозата в огромното мнозинство от случаите се поставя във втория - третия етап от развитието на патологичния процес. В първия и втория стадий от заболяването може да се постигне почти пълно излекуване (129, 130).

2.2.3 Причини

Бъбреците се увреждат по различни патогенетични механизми: имунни, автоимунни, директно увреждане на бъбречните структури, увреждане в резултат на дистрофични промени, съдови аномалии, инфекции и др. Установяват се различни нарушения (49, 114, 214, 219):

а/ В екскрецията на азотни продукти, съпроводена с увеличение на уреята, креатинина, пикочната киселина, гванидините, ароматните амини и др. - това може да доведе до уремичен перикардит, кардиомиопатия, полиневропатия, интравазална хемолиза и други;

б/ В хомеостазната функция с дисбаланс във водно-електролитната хомеостаза и дехидратация или хиперхидратация, хипонатриемия, хипернатриемия, хипокалиемия, хиперкалиемия, хипермагнезиемия, хипокалциемия и хиперфосфатемия – в този случай се развива остеопороза, възниква метаболитна ацидоза;

в/ В ендокринната функция с намалена синтеза на еритропоедин и поява на анемия, намален клирънс на някои хормони: фоликулостимулиращ хормон, лутеинизиращ хормон, пролактин и други.

Най-честите причини за ХБН са захарен диабет, хипертония и хроничен гломерулонефрит. Заедно те причиняват приблизително 75% при всички заболели възрастни. Останалите около 25% се дължат на хроничен полинефрит, хронична поликистоза, обезитас, нефролитиоза, амилоидоза, метаболитен синдром, хиперлипидемия, колагенозни нефропатии, двустранна стеноза на бъбречната артерия, исхемична нефропатия, хемолитично-уремичен синдром, IgA нефрит, употреба на наркотици, системен лупус еритематозус, склеродермия, въздействие на токсични химикали, рефлуксна нефропатия, продължително използване на антибиотици и противовъзпалителни средства и други (125, 129, 204). ХБЗ е по-често сред жените в сравнение с мъжете. Мъжете с ХБЗ обаче са с 50% по-склонни от жените заболяването им да прогресира до ХБН.

2.2.4 Лабораторни показатели

Клиничната лаборатория играе ключова роля в диагностиката и лечението на ХБЗ, независимо от важността на образните техники и бъбречната биопсия. Тя използва бързи, лесни, евтини, високочувствителни и специфични тестове за установяване на нарушена бъбречна функция (66, 125, 127, 129, 196, 197). Широко използваните маркери за лабораторна оценка на бъбречната функция включват:

- Урина – албумин, микроалбуминурия и протеинурия, селективност на протеинурията, индекс албумин/креатинин, трансферин, колаген IV, фибронектин, ламинин, IgG, IgM, хематурия, видове клетки в урината и техните промени, концентрационна способност, електролитен панел (Na, K, Cl, Mg, Ca, PO₄);
- Кръв – кръвна картина с диференциално броене, креатинин, урея, пикочна киселина, калций, албумин, общ белтък, Na и K;
- Гломерулна филтрация и различни клирънси (креатининов, уреен, на различни белтъци).

След въвеждането на различни уравнения за оценка на бъбречната функция и новите начини на класифициране (NKF KDOQI и KDIGO) диагностиката на ХБЗ се подобри в глобален мащаб (52, 92, 93).

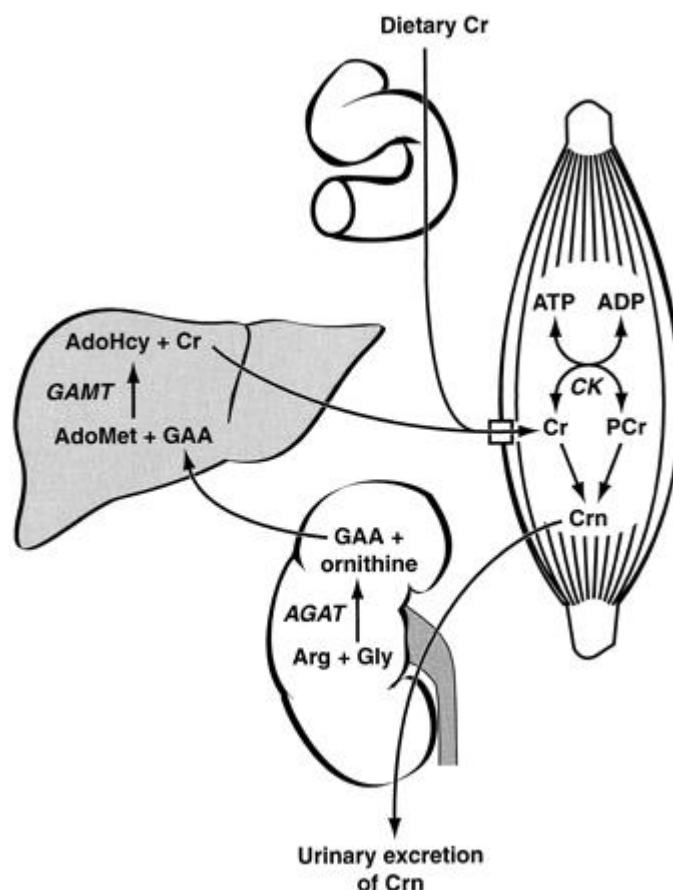
Измерването на ГФ и протеинурията са много полезни, но е налице необходимост и от търсене, използване и валидиране на нови биомаркери. Напоследък биомаркерите се обсъждат съгласно механизмите, които те отразяват (табл. 1). Например, албуминурията отразява засягане на гломерулите и тубулите, а креатининът и цистатин С - ГФ. От друга страна, самата протеинурия и албуминурията увреждат бъбреците. Микроалбуминурията допринася за ранната диагнозата на диабетната нефропатия. Високите нива на креатинин показват по-ниска гломерулна филтрация и като резултат - намаляване на способността на бъбреците да отделят отпадъчните продукти. Серумният креатинин може да бъде нормален в ранните стадии на ХБН, като показателите в урината (протеинурия и хематурия) да са едва набелязани. Увеличението на уреята и други азотни компоненти води до азотемия. Появява се хиперкалиемия с последваща сърдечна аритмия. Претоварването с течности може да доведе до отоци, включително до белодробен оток. Появяват се хиперфосфатемия и хипокалциемия, които се дължат на дефицит на 1,25 дихидроксивитамин D3 поради стимулация на фибробласт растежния фактор-23. Задръжката на сулфати, фосфати и пикочна киселина е в основата на метаболитната ацидоза. Появата на бъбречната анемия се дължи на намален синтез на еритропоетин. **Настъпват морфологични промени в сърдечни-съдовата система, кожата, дихателната и храносмилателната система (52, 196, 197).** **Потиска се имунитетът, увеличават се възпалителните заболявания.** Наблюдават се хипокалциемия и вторичен хиперпаратиреоидизъм, което води до остеопороза и заместване на костната тъкан с фиброзна.

2.3 Биомаркери за оценка на ГФ

Най-често използваните биомаркери за оценка на ГФ са креатинин и цистатин С.

2.3.1 Креатинин

Креатининът е описан още през 1847 г. от Liebig (139, 156, 204, 221). Той е производно на креатина, който се синтезира в черния дроб и бъбреците чрез метилиране на глюкоциamina от S-аденозилметионина. Ежедневно около 1-2% от креатина в мускулите се превръщат в креатинин. Креатининът се произвежда почти с постоянна скорост в зависимост от мускулната маса. Бъбреците играят важна роля в метаболизма на креатина и креатинина (фиг. 2). Те са място както за синтез на креатина, така и за екскреция на креатинина в урината (156, 167, 199, 221). Креатининът не се реабсорбира, но слабо се секретира от проксималните тубули. Когато концентрацията на креатинина в кръвта е в референтни граници, тубулната секреция е слаба, при увеличение на креатинина над 190 $\mu\text{mol/l}$ тубулната секреция се увеличава. Нивото на креатинина в кръвта зависи главно от реналните функции (40, 139). Хиперкреатининемия настъпва, когато ГФ намалява с над 50 – 60%. При пациенти с уремия, при които креатининът е силно увеличен, той преминава в стомашно-чревния тракт чрез дифузия и активира бактериалната креатининаза, креатиназа и дезаминаза. Това води до преразпределение на креатинина. Креатининът е най-широко използваният биомаркер за оценка на бъбречната функция. С него обаче трудно се открива леко бъбречно увреждане. Концентрацията му варира в зависимост от мускулната маса и приема на белтъци (главно месо), пола, възрастта и други (139, 156, 167, 221). При тежко нарушена бъбречна функция креатининовият клирънс е надценен (overestimate) поради активна секреция на креатинин от проксималните тубули. Друг фактор, допринасящ за надценяване, е „екстрареналният клирънс“ поради деструкция в тялото. Има различни пътища за деструкция на креатинина. Последният постъпва в червата и чрез креатининазата се превръща до креатин и отново постъпва в кръвообращението (т. нар. „чревен кръговрат“) (139, 156). Така освен увеличения креатинин има увеличение и на креатина при ХБЗ.



Фигура 2: Схематично представяне на синтеза и екскрецията на креатинина (по Wyss и сътр. 221).

2.3.2 Цистатин С

Цистатин С или цистатин 3 (по-рано известен, като gamma trace, post-gamma-globulin или neuroendocrine basic polypeptide) е белтък, кодиран от CST3 гена (фиг. 3) (3, 8, 10, 11, 31, 55, 146, 149). CST3 генът е локализиран върху късото (p) рамо на хромозома 20 в позиция 11.21. Генът CST3 се намира в цистатин траекторията и се състои от три екзона. При хората всички ядроносни клетки синтезират цистатин С, като верига от 120 аминокиселини (31, 121). Затова той се намира в почти всички тъкани и телесни течности. Най-високите нива са открити в семенната течност, последвани от кърмата, сълзите и слюнката (63, 112, 113). Той е мощен инхибитор на лизозомни протеази и може би един от най-важните извънклетъчни инхибитори на цистеинови протеази. Цистатин С е описан за първи път през 1961 г. като "gamma trace" заедно с друг протеин („beta trace“) в ликвора и в урината на пациенти с бъбречна недостатъчност. Малко по-късно е представена аминокиселинната последователност на цистатин С. Simonsen и сътр. (184)

през 1985 г. го предлагат, като показател за ГФ. Той принадлежи към суперфамилията цистатини. Това са протеини, които съдържат множество цистатин-подобни последователности. Някои от членовете са активни протеазни инхибитори, а други са загубили тази инхибиторна активност. Суперфамилията се разделя на три групи в зависимост от белтъчната структура, биологичните ефекти и разпределението в тъканите и телесните течности (100, 123, 153):

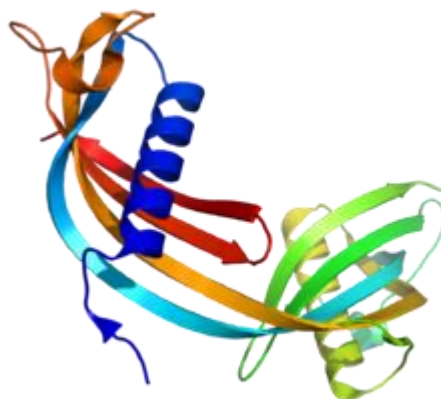
- Фамилия тип 1 са вътреклетъчни или трансцелуларни цистатини известни още, като стефиби; състои се от два основни протеина, цистатин А и В, които са негликозирани инхибитори и ролята им се извява вътреклетъчно;

- Фамилия тип 2 са екстрацелуларни и/или трансцелуларни, известни още, като секреторни цистатини; основните протеини са С, D, Е/М, G, F, S, SA, SN с белтъчна верига съдържаща средно 120 аминокиселини; молекулната им маса е 13-14 kD; част от тях са гликозирани; инхибитори са на цистеинови протеинази, намерени в различни човешки течности и секрети, където осъществяват защитни функции;

- Фамилия тип 3 са вътресъдови цистатини, известни още като кониногени; биват високомолекулни и нискомолекулни.

Отделни членове на суперфамилията цистатини имат роля за (123, 179, 184): а/ туморогенезата; б/ стабилизиране на матричните металопроотеинази; в/ оценка на ГФ; г/ имуномодулацията; д/ някои невродегенеративни заболявания. Цистатин С е член на екстрацелуларната фамилия тип 2 и е основен неин представител (20, 25, 31, 121, 179). Той е негликиран протеин с изоелектрична точка при рН 9,3. Полуживотът му е 1.5 h. Кристалната структура на цистатин С (фиг. 3) се характеризира с къса алфа и дълга алфа спирали и петверижна бета спирала и дисулфидни мостове. Около 50% от молекулата е хидроксилиран пролин. Цистатин С е с ниско молекулно тегло - около 13,3 kD. Той е протеинов инхибитор, който модулира

протеиновата деградация и взаимоотношенията клетка-матрикс. Той регулира вътреклетъчните и извънклетъчните цистеинови протеази. В ЦНС се синтезира от плексусните клетки (29, 63, 118, 119). Той се отстранява от кръвния поток чрез гломерулна филтрация и след това се абсорбира в проксималните тубули чрез рецепторно медирана, мегалин улеснена ендоцитоза и се катаболизира (29, 30, 147).



Фигура 3: Структура на цистатин С (31, 220).

Цистатин С е инхибитор на папаин-подобните цистеинови протеази (28, 50, 60, 171, 201). Той е основен „спешен“ инхибитор на освободени в човешкия организъм пептидази. В началото се приема, че той е независим от хронични и остри възпалителни процеси. Последните проучвания оспорват това, защото по-висока концентрация в серума корелира с възпалителни маркери, като CRP и фибриноген (44, 57, 115, 170, 171). Освен това цистатин С свързва С4-компонент и модулира активиране на класическия път на комплемента. Той може да повлияе върху неспецифичния имунен отговор чрез инхибиране на супероксиди, фагоцитоза, хемотаксис и апоптоза на неутрофилите. По същия начин цистатин С може да модулира специфичен имунен отговор чрез инхибиране на катепсин S, свързвайки мембранните рецептори за TGF-бета или увеличаване на МНС клас II експресията на дендритни клетки (115, 141, 212). Регулира клетъчната пролиферация и предпазва срещу

оксидативни стресове, които редуцират клетъчната смърт и засягат освобождаването на цитокини.

При хората синтеза на цистатин С е доста стабилен процес. Цистатин С не се свързва с нито един от плазмените белтъци. Генната експресия гарантира стабилно производство и константни циркулиращи нива в биологичните течности (53, 63, 179). Не влиза повторно в кръвообращението. В случай на тубулна дисфункция абсорбцията се влошава и цистатин С се елиминира с урината. Затова последните години се предлага и като маркер за бъбречните тубули (29, 74, 99, 194-196). Биологичната роля на цистатин С е твърде разнообразна: а/ антивирусна и антибактериална; б/ при костна резорбция; в/ при туморогенеза и метастазирание; г/ при модулиране на възпалителни процеси; д/ при клетъчна пролиферация и растеж; е/ при астроцитна диференциация (123, 141, 142, 217). Все още няма категоричен отговор на въпроса дали цистатин С е идеалният маркер за оценка на ГФ и трябва ли да замести креатинина? (106, 136, 141, 142, 158, 166, 205, 217). В първоначалните проучвания се твърди, че концентрацията му в кръвта е независима от пола, расата, теглото, мускулната маса, диетата, наднорменото тегло, тютюнопушене и други (98, 122, 136, 144). Всичко това дава предимство на цистатин С пред креатинина (20, 48, 106, 110). Последвалите проучвания обаче показват, че цистатин С не е толкова независим показател (58, 122, 135). Той според някои автори се влияе от възрастта, от телесния състав, от затлъстяването, от възпалителни процеси и т. н. (60, 109, 135). Определянето на цистатин С в тъкани и телесни течности, като например кръвен серум, урина, ликвор и други може да служи като маркер не само за ХБЗ, но и за различни други заболявания, за прогресията на дадено заболяване и ефекта от лечението (12, 28, 29, 61, 62, 138, 206). Промени в концентрацията му са регистрирани при бъбречни заболявания, инфекции на пикочните пътища, рак, хипертония, сърдечно-съдови заболявания, миокарден инфаркт, деменция, исландска

амилоидоза, неврологични заболявания, ревматоиден артрит, лечение с глюкокортикоиди, променена функция на щитовидната жлеза, стареене и т. н. (4, 6, 14, 19, 29, 36, 51, 60, 74, 161, 201). Цистатин С може да предскаже риска от развитие на хронично бъбречно заболяване и е сигнал за състоянието на предклинична бъбречна дисфункция (66-68, 140). Нивото му се променя не само при засягане на бъбречните гломерули, но и при увреждане на тубулите (96). Използването на цистатин С за първи път в клиничната практика започва от момента, когато се установява, че той е показател за ГФ. Оттогава започва сравняването му с креатинина. Ролята на цистатин С за оценка на ГФ през последните години се проучва усилено. Подобно на креатинина, екскрецията на цистатин С при увреждане на бъбреците се влошава. Серумният цистатин С е прост, точен и бърз ендогенен маркер за оценка на ГФ. Въпреки това съществуват противоречиви съобщения относно превъзходството му над серумния креатинин. Несъмнено досега най-често цистатин С се използва за диагностиката на остри и хронични бъбречни заболявания (3, 4, 17, 111, 114, 140, 153). Напоследък той е търсен биомаркер и при редица други заболявания (12, 61, 101, 138, 177, 163, 169, 180, 182, 200, 207).

2.3.3 Методи за определяне на креатинин и цистатин С

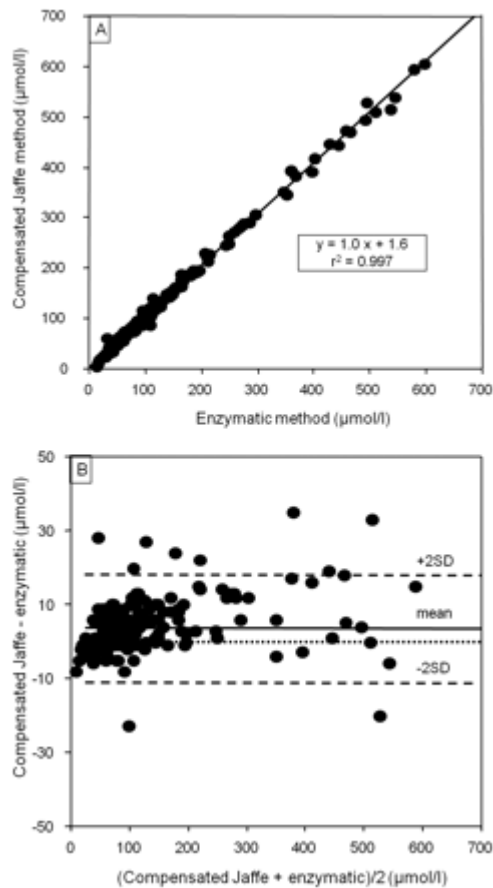
2.3.3.1 Креатинин

Още през 1886 г. Max Jaffe (42, 83, 151, 156, 204) открива реакцията на креатинина с пикринова киселина в алкална среда. С пикриновата киселина в алкална среда креатининът образува оранжево червен цветен комплекс. Промяната в цвета, която се появява е право пропорционална на концентрацията на креатинина в пробата. Освен от креатинина, тази реакция се индуцира и от други органични съединения. Методът е с над 125-годишна история. В началото на XX век Otto Folin адаптира изследванията на Jaffe за клиничната практика. Едва през 1926 г. Rehberg доказва, че креатининът е добър маркер за ренална функция (4, 23, 26, 93, 151, 204). Днес реакцията Jaffe с

използване на алкален пикрат остава крайъгълният камък на методите за рутинно използване след непрекъснати подобрения и преодоляване на присъщите аналитични интерференции и ограничения. Методът на Jaffe, въпреки неспецифичността си, е все още широко използван и предпочитан в рутинната практика. Поради своята скорост, адаптивността за автоматизиран анализ и рентабилността си тази методология продължава да се използва в медицинските лаборатории повече от столетие (32, 42, 137). Неспецифичната реакция Jaffe дава лъжливо високи стойности за креатинина (стигащи до 25%) поради интерференция на белтъци (особено при парентерално хранене), въглехидрати, пируват, пикочна киселина, ацетоацетат, аскорбинова киселина, гуанидин, ацетон, цефалоспорини, кетонни тела, б-кето киселини, билирубин, 5-аминолевулинова киселина и други органични съединения (151, 204). Следващите модификации на метода осигуряват премахване на белтъците в пробата и отчитане на крайната точка на реакцията (end point) в различно време. Между 1960-1970 Jaffe-методите се автоматизират и започва кинетично вместо крайно точково отчитане, при което промяната в абсорбцията се отчита спектрофотометрично при 520 nm. Този подход не само стандартизира процедурата, но не изисква и депотеинизация. През 1980 г. се въвеждат ензимни методи, при които интерференцията на познатите компоненти силно намалява, но се откриват нови интерференти, като 5-флуороцитозин, етамсилат, допамин, добутамин, моноклонални IgM, нитрометан и други субстанции (23, 139, 151). По-късно са разработени HPLC-методи с висока чувствителност и специфичност. Тези методи обаче са скъпи, трудоемки, бавни и трудно приложими в рутинната практика.

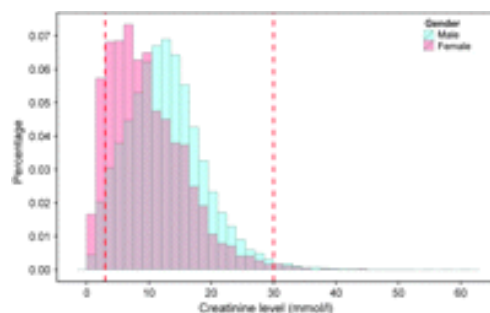
От 2006 г. за референтен метод е приет IDMS (isotope dilution mass spectrometry). За подобряване точността за определяне на креатинина от NIST (National Institute of Standards and Technology), CAP (College of American Pathologists) и NKDEP (National Kidney Disease Education Program) е разработен нов стандарт, наречен сертифициран референтен материал (SRM 967) (23, 114, 124, 151). Със стандарта SRM 967 се цели да се подобри калибрацията на всички използвани методи, включително и на

кинетичните и ензимните. Стандартизирането подобрява откриването, диагностиката и лечението на пациенти с ХБЗ. Това води до промяна на референтните граници на креатинина в серума и урината, както и до промяна в алгоритмите за дозиране на лекарства. През 2013 г. френското дружество по клинична биохимия провежда проучване за сравнение на тестовете за кинетични и ензимни методи от различни производители (23). Креатининът се определя в три серумни пула на нива $35,9 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$, $74,4 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ и $97,9 \pm 1,7 \mu\text{mol/L}$ (съгласно анализа по IDMS-метода) (23). След проведените анализи и статистическа обработка данните се сравняват с желаните критерии на NKDEP. С ензимните методи резултатите винаги попадат в желателната обща грешка от 7,6%. При кинетичните методи в ниското ниво ($35,9 \pm 0,9$) тази спецификация се постига само от единични производители на тестове за креатинин. Получените данни показват, че въпреки значително подобрение през последните години при сравнение с IDMS-метода кинетичните Jaffe-методи, за разлика от ензимните, не достигат желаните спецификации на NKDEP при нормални нива на креатинина (фиг. 4) (22, 23, 133, 137). Благодарение на новия стандартизиран референтен материал (SRM 967) методите на Jaffe вероятно ще продължат да се използват. У нас се използват главно кинетичният Jaffe-метод и по-рядко ензимният метод, който е с по-висока цена.



Фигура 4: Сравнение между определянето на креатинина чрез ензимния и кинетичния Jaffe-метод ($n = 199$ възрастни пациенти, $\text{mean} \pm \text{SD} = 130.2 \pm 1.7 \mu\text{mol/L}$, $R^2 = 0.997$, $P < 0.05$). (A) - унивариантна връзка. (B) Bland и Altman плот ($\text{mean} \pm \text{SD}$ за разликата = $3.9 \pm 7.4 \mu\text{mol/L}$) (по Vassetta и сътр., 15).

За определяне на креатинина в урината се използват същите методи, както в серума, но се изисква разреждане. Разпределението и в урината е близко до гаусовото (фиг. 5).



Фигура 5: Разпределение на креатинина в урината от 49506 проби при мъже, жени и общо (мъже зелено, жени червено, общо лилаво) (Cocker и сътр., 32)

2.3.3.2 Цистатин С

Съществуват различни методи за измерване концентрацията на цистатин С в серума/плазмата. През 1979 г. Lofberg и Grubb (121) за

първи път разработват и предлагат ензимно амплифицирана радиална имунодифузия за определяне на цистатин С. Методът е прост, но бавен и недостатъчно точен, особено в ниските концентрации. По-късно последователно се предлагат флуорометричен метод - през 1983 г. от Polulik и сътр.; ензимно-свързан имуносорбентен метод (ELISA) - през 1986 от Joronen и сътр. и други (55, 95, 128, 184, 185). Тези методи са по-чувствителни от радиалната имунодифузия, но резултатите им са трудно сравними поради липса на стандартизация. По-късно започва използването на методи с отчитане на комплексите антиген-антитяло – турбидиметрично или нефелометрично. Чувствителността и специфичността на тези методи се доближава до тези на останалите методи, но като цяло са по-добри. При тях антителата се прикрепват към специално обработени латексови частици с различен диаметър (38 или 80 nm) (91, 120, 142-144, 162). Натоварването на частиците става с поликлонални заешки антитела. В последните години се предлагат и различни моноклонални антитела (162). Образуваните имуноагрегати се отчитат при доста различна дължина на вълната (от 340 nm до 840 nm). Концентрацията се изчислява чрез интерполация на получения сигнал по 6 точки на калибрационната крива. Kyhse-Andersen и сътр. през 1994 г. (105), Newman и сътр. през 1995 г. (142), Finney и сътр. през 1997 г. (56) предлагат използването на имунологични методи: PETIA (particle enhanced immunoturbidimetric assay) и PENIA (particle enhanced immunonephelometric assay). Те са бързи, автоматизирани, прецизни и достатъчно чувствителни (24, 56, 60, 79, 105, 120, 142). Те са линейни в широки граници (от 0.05 до 8 – 9 mg/l). Hossain и сътр. (79) сравняват три метода - PETIA PENIA и ELISA, за определяне на цистатин С в 80 нормални човешки серума и в 20 - от пациенти с бъбречно и/или сърдечно заболяване. Оценяват се корелациите и ROC-кривите. Те установяват значима корелация между ELISA и PENIA ($r=0.94$) за целия анализиран диапазон и PETIA и PENIA ($r = 0.95$). Средната разлика между ELISA и PETIA е $0.65 \pm 0.63 \mu\text{g/ml}$, а между ELISA и PENIA е 0.58 ± 0.53

$\mu\text{g/ml}$ (120). За разлика от многото усилия, които се полагат за стандартизация на креатинина, по отношение на цистатина това не е така. Едва през 2010 г. IFCC-работната група за стандартизация (WG-SCC) в сътрудничество с IRMM (институт за референтни материали и методи) обяви наличието на новия сертифициран референтен материал ERM-DA471/IFCC за стандартизация на цистатин С (67, 78, 95, 124). Материалът е рекомбинантен референтен чист протеин, който може да се използва за калибриране на цистатин С-методите. С този материал могат да се калибрират имунотурбидиметрията, имунонефелометрията и ензимната радиална имунодифузия (72, 213). При определяне на цистатин С с тези методи не е установена интерференция при концентрация на хемоглобина 10 g/l , на билирубина - $35 \mu\text{mol/l}$, на триглицеридите – 5 mmol/l и на ревматоидния фактор - 1200 IU/mL . Чрез мултирегресионен анализ е установена висока корелация между турбидиметрията и нефелометрията ($r = 0.929$) (51). Нефелометричните методи дават малко по-ниски резултати, макар средната разлика да е $0.02 \pm 0.43 \text{ mg/l}$, т.е. да е незначителна (24, 120, 128, 213). Двата метода - турбидиметрия и нефелометрия, са високо специфични и чувствителни (51, 91, 120, 128, 213). У нас цистатин С се определя главно чрез имунотурбидиметрия. Определянето на цистатин С е по-скъп тест от определянето на серумния креатинин. Неотдавна в Mayo Clinic Lab бяха оценени нови цистатин С-частици за метода PETA, който е съпоставен с метода PENIA (фиг. 6) (128). Отклонение (bias) максимум до 23% се среща почти постоянно в измерените граници. Те препоръчват въвеждането на метода PETA в рутинната практика. Нови данни от 2012 г. на Voskoboev и сътр. (213) показват, че цистатин С може да бъде точно измерен чрез PETA-метод с рутинни биохимични анализатори, ако е проследим с приетия международен референтен материал ERM-DA471/IFCC (табл. 2). Подчертава се голямото значение на стандартизацията с ERM-DA471/IFCC-материала. Авторите валидират аналитично и клинично PETA и го сравняват с метода PENIA. Резултатите

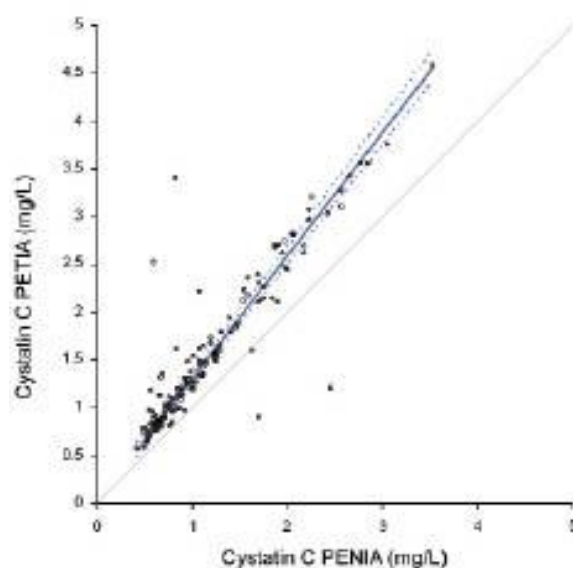
при прилагане на метода PENIA са по-ниски. Референтните граници са: 0.55–1.15 mg/L за възраст от 1 до 50 г. и от 0.63–1.44 mg/L за възраст над 50 г. (73, 162).

Таблица 2: Сравнение на методите за определяне на цистатин С в серума (по Finney и сътр. (56-58))

Метод	Откриване граница, $\mu\text{g/L}$	CV, %	Продължителност на анализа в часове	Рефер.интервал средна \pm SD (и граница), mg/L	Брой изследвания
RID	300		38	1.3 ± 0.26 (0.72–1.7)	46
EIA	30	10–12	16	1.1 ± 0.42 (0.63–2.5)	30
EIA	0.9	3–9	2 hs	1.78 ± 0.26 , female	33
				2.14 ± 0.31 , male	
PETIA	150	2.0–3.2	7 mins	(0.61–1.21)	27
PETIA	27	3–5	5 mins	<1.25	
PENIA	170	3–5	6 mins	(0.64–1.04)	30

2.3.3.3 Референтни стойности на двата биомаркера

През 2012 г. Siest и Henry (183) разглеждат въпроса за референтните стойности и го сравняват с незавършена симфония. Референтните граници (или интервали) обикновено описват варианти на стойността на даден лабораторен показател при здрави индивиди или подходящи контроли. Те са основа за лекаря за тълкуване състоянието на определен пациент.



Фигура 6: Сравнение на резултатите за цистатин С, определен чрез PENIA и PETA. Отклонение (bias) максимум до 23% се среща почти постоянно в измерените граници (по Mayo Med Lab, 128).

През 2012 г. Siest и Henry (183) разглеждат въпроса за референтните стойности и го сравняват с незавършена симфония. Референтните граници (или интервали) обикновено описват варианти на стойността на даден лабораторен показател при здрави индивиди или подходящи контроли. Те са основа за лекаря за тълкуване състоянието на определен пациент.

Стандартът за референтните граници се определя като интервал, в който попадат 95% от стойностите на референтната група, при което 2,5% от стойностите са по-ниски от долната граница на този интервал, а 2,5% - по-високи от горната граница на този интервал, независимо от разпределението на тези стойности. Методите за оценка се базират основно на нормално или лог-нормално разпределение на стойностите. В исторически аспект има няколко етапа в установяването на референтни стойности. Според последният етап – в периода 2001 - 2012 г., има нова концепция за референтните стойности, която заменя понятието за нормалност, чието определение е неясно. Създаването на собствени референтни стойности е много отговорно. Много често за това се изисква освен всичко друго и владението на новите технологии като HPLC, GCMS и PCR (183). Бързото развитие на персонализираната медицина в крайна сметка изисква използването на индивидуалните референтни стойности, което се очаква в близко бъдеще да стане реалност. Референтните стойности зависят от различни физиологични процеси и от множество биологични фактори, които определят характеристиките на всяка популация (18, 22, 174, 181). IFCC-LM публикува международни и национални (френски, испански, скандинавски) разработки за референтните стойности (174). По настоящем отново се очертава необходимостта от преразглеждане на този въпрос. IFCC-LM създаде референтните интервали (RIS). През 2008 г. IFCC-LM прави ревизия и

публикува нови насоки за стандартизация (CLSI C28-A3) в клиничната лаборатория. Основата на теорията за референтните стойности не се е променила, но са посочени нови пътища, като RIS пренасяне, многоцентрови референтни интервали и специално метод за извличане на RIS от малък брой пациенти. Важна алтернатива за набиране на здрави индивиди е възможността да се използват биобанки (183).

Референтните стойности за креатинина продължават да са обект на дискусия въпреки много дългата история на проучването му (28, 57, 58, 59, 183). Ceriotti и сътр. през 2008 г. (28) обобщават референтните стойности за креатинина, събрани от 37 литературни източници на база данни в медлайн за периода 1987 - 2007 г. Обработени са всички съобщения, третиращи понятията "референтен интервал", "референтни стойности", "референтен диапазон" и т. нар. "нормални стойности". Авторите се ръководят от следните четири критерия съгласно препоръките на IFCC и CLSI C28-A2 документ: а/ правилен подбор на индивидите; б/ максимална коректност на резултатите; в/ аналитична коректност на използваните методи; г/ добра статистическа обработка на данните. Обработените данни са представени в таблици 3 и 4.

Според авторите посочените референтни граници могат да бъдат приети от всяка лаборатория. Съпоставимост на резултатите, получени при лица идващи от различни страни (Германия, Скандинавските страни, Австралия), засилва заключението, че предложените стойности са универсално валидни за белите хора. Данните са получени с ензимен метод за определяне на креатинина, но са валидни и за стандартизиран кинетичен Jaffe-метод. Наскоро Институтът за клинични и лабораторни стандарти (CLSI) предложи референтни интервали въз основа на представителна група от 2246 възрастни и 998 деца на възраст от 8 до 70 години, получени чрез прилагане на кинетичния метод на Jaffe. Референтните интервали за серумен креатинин чрез ензимния метод са 54-107 $\mu\text{mol/l}$ за мъжете и от 50-93 $\mu\text{mol/l}$ за жените. Според Burtis и сътр. (26) за пациенти на възраст от

18 до 60 години стойностите са 80-115 $\mu\text{mol/L}$ за мъже и 53-97 $\mu\text{mol/L}$ за жени. При пациенти на възраст от 60 до 90 години стойностите са 71-115 $\mu\text{mol/L}$ за мъже и 53- 106 $\mu\text{mol/L}$ за жени.

Таблица 3: Референтен интервал за креатинин ($\mu\text{mol/L}$) при възрастни (18-74 г.) (по 28)

Пол	Брой	Персентиля (95% ДИ)	
		2,5	97,5
Мъже	120	64 (63–66)	104 (99–107)
Жени	120	49 (46–55)	90 (83–103)

Таблица 4: Референтен интервал за креатинин в серума за деца при използване на непараметричен метод за обработка. (Креатининът е изразен в $\mu\text{mol/l}$, n е броят на пациентите, p е съответният персентил) (Ceriotti и сътр., 28).

Възрастови групи	Брой	Персентили (НМ)		Средна възраст	Персентили (ДП)	
		2,5	97,5		2,5	97,5
Пъпна връв	51	46	86		-	-
Недонос. (0 – 21 ден)	58	28	87	При раждане	29	90
Термин (0–14 ден)	69	27	81	7 дни	22	73
2 мес. до 1 год.	41	14	34	7 месеца	11	34
1 – 3 години	45	15	31	2 години	15	30
3 – 5 години	41	23	37	4 години	21	34
5 – 7 години	43	25	42	6 години	26	40
7 – 9 години	46	30	48	8 години	31	46
9 – 11 години	47	28	57	10 години	35	53
11 – 13 години	42	37	63	12 години	38	59
13 – 15 години	38	40	72	14 години	41	65

НМ – непараметричен метод, ДП – дробни полиноми

Поради много добра корелация ($r = 0.968$) между референтно стандартизирани ензимен и кинетичен Jaffe-методи IFCC препоръча общи референтните интервали за глобални приложения, които са $64\text{-}104 \mu\text{mol/l}$ за мъже и $49\text{-}90 \mu\text{mol/l}$ за жени. Съпоставимостта на получените резултати потвърждава приложимостта на наскоро направените препоръки за "общи" референтни интервали за серумните концентрации на креатинина. Референтните граници за креатинина в урината са $500 - 2000 \text{ mg/d}$. Концентрацията в урината се увеличава с възрастта и намалява след 65-годишна възраст. Креатининът в урината при мъже е $20\text{-}25 \text{ mg/kg/day}$ (грубо 1575 mg/day за мъж с тегло 70 килограма), а при жени е $15\text{-}20 \text{ mg/kg/day}$ (грубо 1050 mg/day за жена с тегло 60 килограма). Референтните стойности за креатинина в урината по възраст са:

- $300 - 1300 \text{ mg/d}$ при пациенти на 9 – 12 г.;
- $700 - 1600 \text{ mg/d}$ при пациенти на 15 – 50 г.;

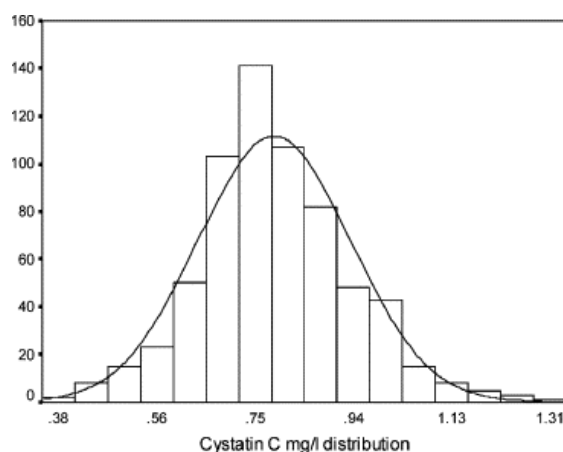
- 800 – 2100 mg/d при пациенти на 51 – 80 г.

Трябва да се има предвид, че концентрацията на креатинина в урината се различава в зависимост от приема на вода и течности (26, 33).

Ниските стойности на серумния креатинин се срещат рядко. Те почти винаги отразяват слаба мускулна маса. Теоретично ниските стойности могат да отразяват също така повишено ниво на гломерулна филтрация. Хиперкреатининемия се наблюдава при намалена ГФ и е важен лабораторен симптом на остро бъбречно увреждане или хронично бъбречно заболяване. При хроничното заболяване увеличението е сравнително слабо в най-ранните етапи на болестта (например пациент, чийто изходен креатинин е 53 $\mu\text{mol/l}$, ще трябва да загуби повече от 50% от своята ГФ, преди креатининът да се увеличи до 115 $\mu\text{mol/l}$). Това налага практиката, приета от много лаборатории по света, при пациенти над 18-годишна възраст заедно с всеки анализиран серумен креатинин да се отчита и ГФ, защото при неговото изчисление се вземат предвид и някои допълнителни показатели (80, 86). Не са малко регистрираните случаи на нормален или леко увеличен серумен креатинин със значително намаление на ГФ. Например бяла жена със серумен креатинин от 88 $\mu\text{mol/l}$ (т.е. в норма) показва ГФ от 59 mL/min/1.73 m² (стойност в съответствие с ХБЗ). Все пак изчисляването на ГФ с помощта на креатинина не е лишено от грешки, особено при деца, при пациенти в напреднала възраст (на повече от 65 г.), при бременни, при хора, при които са налице недोхранване, параплегия, мускулни заболявания и други. В някои случаи по-точна информация относно ГФ може да се получи от креатининов клирънс с анализ на креатинина в урината и серума (26, 33). Важно изискване в този случай е точното събиране и измерване количеството на урината.

Референтните стойности на цистатин С са предмет на различни проучвания (5, 38, 57, 58, 59, 148, 212). Според повечето автори разпределението на цистатин С е близко до Гаусовото (фигури 7 и 8). Ognibene и сътр. (148) представят разпределението на цистатин С при 139

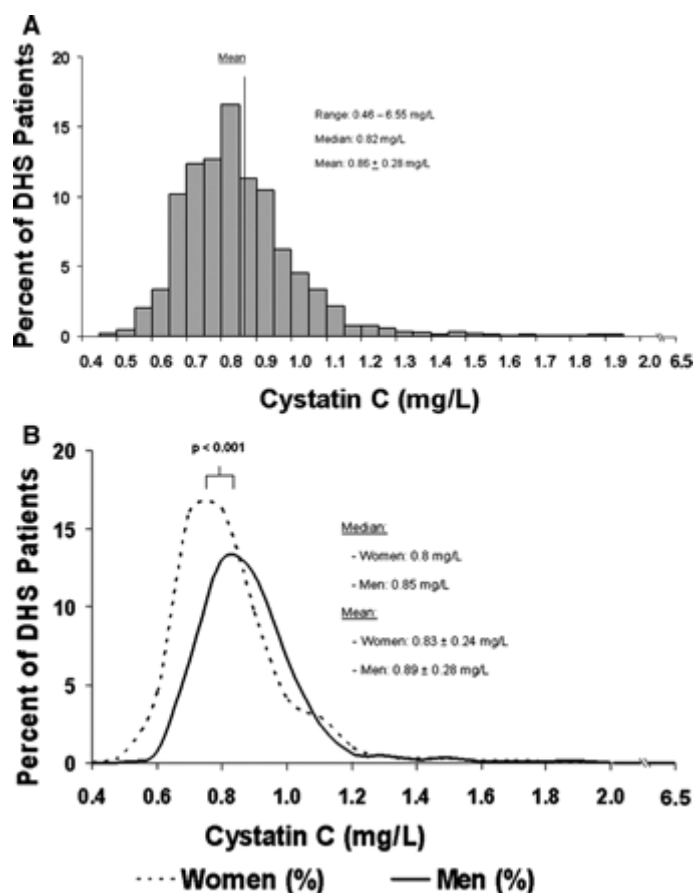
зdrави възрастни пациенти (78 жени и 61 мъже) и установяват, че то е близко до Гаусовото (фигура 7, 8, 9). При 95% стойностите за 78 здрави жени са 0.51-0.94 mg/l – средно 0.65 mg/l; за 61 здрави мъже са 0.48-0.98 mg/l - средно 0.70 mg/l. Представени са данни и за свързани с възрастта референтни интервали за цистатин С (при пациенти под 45 години - < 0.95 mg/L; при пациенти над 45 години - < 1.20 mg/L). Тази разлика налага грижливо обсъждане на референтните стойности, които следва да бъдат съобразени с възрастта.



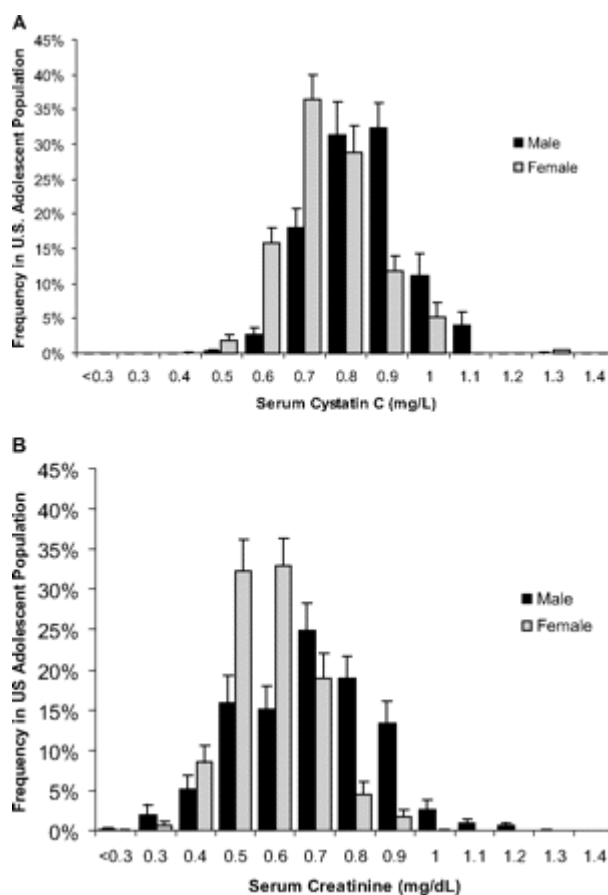
Фигура 7: Разпределение на цистатин С при здрави възрастни пациенти (по Ognibene и сътр., 148)

Има данни за наличие на статистически значима ($p < 0.001$) разлика в разпределението на цистатин С между възрастните жени и мъже, независимо, че и при двата пола то е тип Гаусово. Други автори (51, 109, 150) доказват, че при клинично здрави лица на възраст от 12 до 19 г. също се наблюдава ясна разлика между двата пола в серумните нива на цистатин С, като при жените нивата са по-ниски. Авторите не се ангажират с оценка дали серумният цистатин С е по-добър биомаркер за бъбречната функция в сравнение с креатинина. Влиянието на пола и расата са почти еднакви за двата маркери, докато възрастта има много по-малък ефект върху цистатин С, отколкото върху креатинина (65). Според различни проучвания от 5-ти до 95-ти перцентил средните стойности се движат между 0,52 и 0,98 mg/l и между 0.50 до 1.03 mg/l (табл. 5 - 7). При жените средният референтен

интервал е от 0,52 до 0,90 mg/l със средна стойност от 0,71 mg/l, а при мъжете - от 0,56 до 0,98 mg/l, средно 0,77 mg/l. При бебета цистатин С е доста висок (до 20-40 mg/l) и идва от майката, след това бързо спада и при децата стойностите са по-ниски. Повишават се след 50-годишна възраст, а след 80-годишна възраст може да бъдат над 50% по-високи в сравнение със стойностите на пациенти на средна възраст (95).



Фигура 8: Честота на разпределение на серумния цистатин С в mg/L по метод РЕТІА: А/ общо за жени и мъже; В/ отделно за жени и мъже (по Ogniprene и сътр.) (148)



Фигура 9: Графично представяне на разпределението на цистатин С и креатинин в серума при юноши,отделно за момчета и момичета (по Гроебек и сътр.) (65)

В САЩ едно голямо проучване, което използва I-ви и 99-ти персентил, установява стойности между 0,57 и 1,12 mg/l за жените и 0,55 - 1,18 mg/l за мъжете. Установено е, че испанците, чернокожите и мексиканците имат по-ниски нормални нива на цистатин С от останалите хора (143).

Таблица 5: Референтни стойности за цистатин С на здрави доброволци с метода РЕТІА (mg/l) (Uhlmann и сътр.) (212)

Група	Брой	Граници	Гор. реф. граница CI 95%
Жени	78	0.51–0.97	0.94 (0.81–0.97)
Мъже	61	0.4–1.03	0.98 (0.87–1.03)
Кавказци	86	0.4–1.03	0.92 (0.87–1.03)
Общол	139	0.4–1.03	0.92 (0.85–1.03)

Неотдавна Мајо clinic lab (128) установява следните референтни стойности за цистатин С за различните възрасти с метода РЕТІА (табл. 6):

Таблица 6: Референтните стойности за цистатин С (по 128)

Възраст		Цистатин С mg/l	
От	До	От	До
0	3 месеца	0,81	2,32
4	11 месеца	0,65	1,49
1	17 години	0,50	1,27
Възрастни \geq 18 г.		0,49	1,13

За цистатин С референтните интервали под 1-годишна възраст са по-високи поради недоразвитост на бъбреците, а при креатинина липсва такава тенденция и той се влияе единствено от мускулната маса по време на растежа (21). Има намаление в нивото на цистатин С до края на първата година от живота, след това то остава стабилно и се повишава отново, особено след 50-годишна възраст. За разлика от цистатин С при креатинина се наблюдава повишаване на стойностите до пубертета и се установява зависимост от пола, мускулната маса и расата (21, 57). Има данни, които показват, че нивото на серумния цистатин С е по-високо у пациенти с по-високо тегло и затлъстяване в сравнение с контролната група, както при мъжете, така и при жените (21, 92, 143) (табл. 8). Най-често приетите референтни граници за цистатин С в урината са 0.01 – 0.28 mg/l (103).

Таблица 7: Резюме на получените референтни граници за цистатин С и креатинин (по Finney и сътр.) (56-58)

Възраст	Общо		Момичета		Момчета	
	n	Средна/медиана (от – до)	n	Средна/медиана (от – до)	n	Средна/медиана (от – до)
Цистатин С (mg/l)						
24–28 седм.	16	1.48 (0.65–3.37)	–	–	–	–
29–36 седм.	14	1.65 (0.62–4.42)	–	–	–	–
0–3 мес.	50	1.37 (0.81–2.32)	14	1.28 (0.73–2.26)	19	1.37 (0.85–2.22)
4–11 мес.	29	0.98 (0.65–1.49)	12	0.94 (0.64–1.35)	17	1.00 (0.63–1.57)
1–3 г.	53	0.79 (0.50–1.25)	27	0.76 (0.47–1.21)	26	0.83 (0.57–1.21)
4–8 г.	70	0.80 (0.49–1.29)	32	0.74 (0.49–1.11)	38	0.86 (0.52–1.41)
9–17 г.	59	0.82 (0.53–1.29)	27	0.83 (0.49–1.45)	32	0.80 (0.56–1.14)
Креатинин (μmol/l)						
24–28 седм.	16	78 (35–136)	–	–	–	–
29–36 седм.	14	75 (27–175)	–	–	–	–
0–3 мес.	46	47 (23–127)	11	47 (36–131)	18	50 (35–111)
4–11 мес.	29	42 (32–100)	12	40 (32–59)	17	42 (34–100)
1–3 г.	53	45 (33–60)	27	43 (17–60)	26	48 (34–63)
4–8 г.	70	57 (40–82)	32	54 (38–79)	38	59 (40–83)
9–17 г.	59	66 (46–94)	27	69 (46–92)	32	66 (43–111)

Таблица 8: Средна ± SD на цистатин С в mg/L за мъже и жени

Група	Мъже (mg/L)	Жени (mg/L)
Контроли	1.39±0.10	1.19±0.10
Наднормено тегло	2.42±0.08	2.27±0.07
Затлъстяван	3.15±0.08	2.85±0.05

2.4 Гломерулна филтрация (ГФ, GFR)

Скоростта, с която бъбречните гломерули филтрират ненужните съставки от кръвта в капсулата на Bowman и след това в урината, се нарича гломерулна филтрация (ГФ, GFR, glomerular filtration rate). ГФ се определя, като обем от плазмата (изразен в ml), която може напълно да се изчисти от дадена субстанция чрез бъбреците за единица време (изразено в min или sec съгласно SI системата) (1, 6, 25, 26, 34, 36, 39, 40, 52, 97, 99). В центъра на физиологичното поддържане на ГФ е разлика в базалния тонус на

аферентните и еферентните артериоли (фиг. 10). ГФ е равна на клирънса, ако всяка плазмена съставка се филтрира свободно и не се абсорбира и не се отделя чрез бъбреците. Бъбреците филтрират приблизително 1000 л. за 24 часа, а количеството отделена урина за същото време е 1-3 л. Липсва прост и практичен начин за директно измерване на ГФ. Тъй като това е най-добрият индикатор за бъбречната функция и бъбречния резерв при липса и наличие на заболяване, точното му определяне е необходимо за вземане на оптимални решения (99, 153). Когато ГФ падне под определен праг, здравословното състояние се влошава (3, 82, 84, 142, 170). Проследяването на този показател е важно за контролиране на заболяването и за неговата прогноза (109, 110) Той е важен и за дозировката на нефротоксичните лекарства. Обикновено ГФ се отчита в милилитри филтрирана плазма за минута. Освен това по настоящем за стандарт е прието филтрираното количество да се отнесе към телесна повърхност, или 1.73 m^2 . Праг за диагностика на ХБЗ се приема ГФ под $60 \text{ mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$. ГФ е от съществено значение за откриване, управление и оценка на ХБН. Поради трудното ѝ измерване обикновено се оценява по серумни маркери. Има няколко различни техники, използвани за изчисляване или приблизителна оценка на ГФ (34, 68, 80, 136). Клирансът е обемът на кръвната плазма, който се изчиства от даден компонент за единица време и е полезна мярка за приравняване към ГФ (32, 33). Когато ГФ е равна на клирънса на дадено вещество, може да се използва класическата формула:

$$C_{Cr} = \frac{U_{Cr} \times V}{P_{Cr}},$$

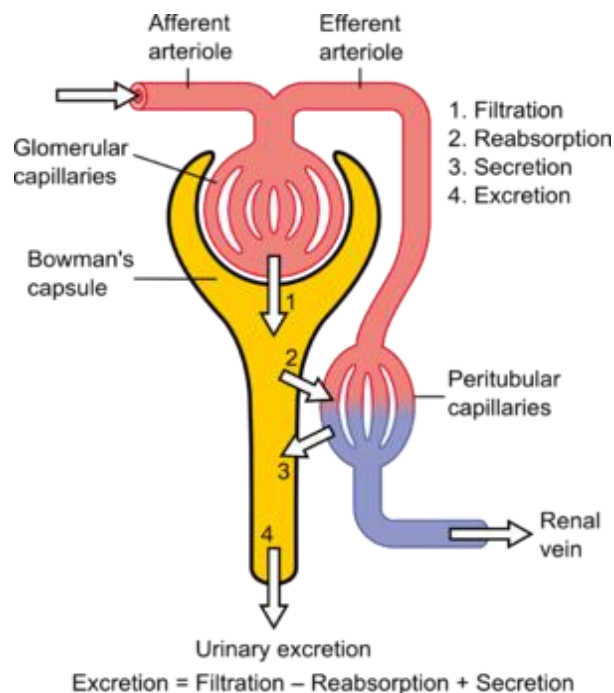
където C_{Cr} е кретининов клиранс, U_{Cr} е концентрация на креатинина в урината, V е обем на урината в милилитри за единица време и P_{Cr} е концентрация на креатинина в плазмата/серума.

Поради различната телесна маса при хората се прави корекция и за телесната повърхност (BSA, body surface area) и ГФ се изчислява в mL/min/1.73 m² съгласно формулата:

$$C_{Cr-corrected} = \frac{C_{Cr} \times 1.73}{BSA},$$

където C_{Cr-corrected} е коригиран креатининов клирънс, съобразен с телесната повърхност, а BSA е телесната повърхност. Тази класическа формула е подходяща за оценка на ГФ при следните случаи: а/ нормален серумен креатинин с гранична ГФ 100-60 ml/min/1.73 m²; б/ в терминалните стадии на ХБН за преценка на нуждата от диализа; в/ при използване на нефротоксични медикаменти.

За оценка на бъбречната функция е необходимо да се познават филтрацията, реабсорбцията, секрецията и екскрецията на биомаркера с който ще се определя клирънса, респективно ГФ (фиг. 10). Гломерулните капиляри и Ванман-овата капсула са основните участници във филтрацията. Тубулите играят основна роля в реабсорбцията, секрецията и катаболизма на маркера. Маркерите биват екзогенни и ендогенни.



Фигура 10: Схематично представяне на основните процеси в бъбреците – филтрация, реабсорбция, секреция и екскреция (133, 176, 195, 196).

2.4.1 Екзогенни маркери за гломерулна филтрация

Съществуват голям брой екзогенни вещества за оценка на ГФ. Това са добре познати компоненти с различна структура, разпределение в кръвообращението и елиминиране през бъбреците. Те се инжектират и след определен период от време се анализират в кръвния серум и/или урината или в двете биологични течности. Идеалният екзогенен маркер за оценка на ГФ трябва да се филтрира свободно от гломерулите, да не се реабсорбира, секретира или метаболизира чрез бъбреците, да е физиологично инертен, да няма екстраренална секреция, да не се свързва с плазмените белтъци и да не променя бъбречната функция (144). На тези изисквания най-точно отговаря инулинът или неговия аналог синистрина. Инулинът се смята за „златен стандарт“ за измерване на ГФ, особено при деца. След инжектиране на инулин се събира урина, която се изследва. Алтернативен метод, който се извършва без събиране на урината, е определянето на плазмения клирънс на инулин в 1 кръвна проба (33). Друг екзогенен маркер е Iothaldate, който се прилага в нерадиоактивна и радиоактивна форма. ^{125}I -Iothaldate е широко приета за измерване на ГФ. Той е евтин, широко достъпен, стабилен в биологичните течности и рядко показва нежелани реакции. В Европа често се използва и ^{51}Cr -EDTA. Този маркер осигурява получаването на адекватни резултати, както при възрастни, така и при деца, още повече, че напоследък броят на кръвни проби се свежда до минимум - често се разчита само на 1 кръвна проба. Когато за определяне на концентрацията се използва урина, много важно е правилното събиране и измерване на обема ѝ. Въпреки известни предимства на тези екзогенни маркери тяхното използване е ограничено, особено в рутинната практика. Методите за прилагането на тези маркери са сложни, отнемат доста време, инвазивни са, свързани са с високи цени, изискват събиране на урина и/или вземане на няколко кръвни проби. Понякога могат да се наблюдават нежелани алергични и токсични реакции. Изисква се време за постигане на стабилно състояние. Някои от маркерите се свързват с плазмени белтъци, макар

в минимално количество. Други се секретират от тубулите или се реабсорбират (153, 198).

2.4.2 Ендогенни маркери за гломерулна филтрация

Идеалният маркер за ГФ трябва да се синтезира в тялото и то с постоянна скорост, независимо от възраст, пол, тегло и здравословно състояние. Трябва да се филтрира и да се отделя чрез бъбреците без тубулна секреция и реабсорбция, да няма екстраренално елиминиране и след постъпването в урината да е стабилен, за да може по-късно да бъде анализиран. Филтрираното вещество може да се измери в кръвния серум, в урината или в двете биологични течности. Плазменото ниво на всички протеини, които се филтрират свободно през гломерулната мембрана, могат да бъдат използвани, като маркер за ГФ (66). Пример за това са цистатин С, alpha-1-microglobulin, бета-2-микроглобулин, ретинол, свързващ протеин (RBP), комплементен фактор D, beta-trace протеин (BTP) и свободни капа- и ламбда-вериги. Диагностичната ефективност на тези маркери за ГФ основно се определя от постоянството в тяхния синтез и от свободната им филтрация през гломерулите и тубулната абсорбция (133). Постоянният синтез на тези белтъци във всички тъкани на тялото и неповлияването им от нормални и патологични изменения силно благоприятства използването им, като маркери за ГФ. Досега е доказано, че цистатин С е един от най-добрите протеинови маркери, защото отговаря на тези изисквания.

Цистатин С по принцип има по-добра диагностична ефективност от креатинина (106, 136, 158, 159, 166, 205). През 2013 г. на Европейския конгрес по клинична лаборатория Grubb (66) съобщава, че освен цистатин С, алфа-1-микроглобулинът (свободен протеин НС) също е много добър ендегенен маркер. Той е стабилен и с високо ниво в урината на здрави хора. Необходими са допълнителни изследвания за доказване ползата от неговото изследване за оценка на ГФ (66). Няколко белтъка с малка молекулна маса - β 2-микроглобулин, ретинол-свързващ протеин и алфа-1-микроглобулин, са

изследвани за установяване на тяхната полезност в мониториране на ГФ (66, 133, 152, 208, 214, 214, 225). Нито един от тях не се оказва полезен главно поради влиянието на небъбречни фактори. Друго обстоятелство, ограничаващо използването на тези белтъчни маркери е, че синтезът им се влияе от инфекции, хранителни фактори и заболявания на черния дроб.

Уреята е едно от първите ендогенни вещества, измерено в серума или плазмата за оценка на бъбречната функция, но понастоящем не се използва поради вариабилна синтеза и реабсорбция, зависимост от хидратацията и аналитична интерференция. Над 90% от карбамида се отделя чрез бъбреците. Уреята се филтрира свободно от гломерулите и голяма част (40-70%) се реабсорбира пасивно през бъбречните каналчета Това води до подценяване на ГФ. Друг ендогенен маркер е пикочната киселина, но тя също не се използва. Най-често и от най-продължително време, като ендогенен маркер се използва креатининът (27, 133, 156, 167, 195, 204). Повече от 80% от клиничните лаборатории по света определят ГФ чрез измерването на серумния креатинин. Поради факта, че много от детерминантите на креатинина са променливи (възраст, пол, мускулна маса, раса и др.), при оценка на ГФ се изисква и тяхното отчитане. Затова в различните уравнения са включени лесно измерими клинични променливи, като заместители за тези неотчетени физиологични процеси с цел предоставяне на по-точни оценки, отколкото само на серумните нива. Въпреки това уравненията не са еднозначни и лишени от известни грешки за някои от тези физиологични процеси, което води до неточности в изследванията на някои пациенти (58, 80). Креатининовият клирънс (Scr) може да изисква събиране на урина през определен период – 24, 12 или 6 часа, за да се определят по-точно концентрацията на екскретирания креатинин и точното му количество за минута. Креатининовият клирънс е почти еквивалентен на ГФ. През последното десетилетие NKF (National Kidney Foundation) и K/DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative) (141) препоръчват използването на креатининовия клирънс и формулите C&G и MDRD за оценка на ГФ (92, 93, 133). През последното десетилетие цистатин С все повече се използва за оценка

на ГФ самостоятелно или в комбинация с креатинина. Дали цистатин С ще замести използването на креатинина, остава да бъде решено в близко бъдеще.

2.4.3 Формули за изчисление на ГФ

Формули за изчисляване на ГФ с креатинин (113, 115, 116, 126, 188, 197, 211).

1. Формула на Cockcroft и Gault (C&G). Тя е предложена през 1976, след което претърпява редица модификации.

$$C_{Cr} = \frac{(140 - \text{възраст}) \times BW}{0.815 \times Scr \mu\text{mol/l}} \times (0.85 \text{ за жени}),$$

където C_{Cr} е креатининов клирънс; BW – телесно тегло в кг, Scr – серумен креатинин в $\mu\text{mol/l}$;

$$eC_{Cr} = \frac{(140 - \text{Age}) \times \text{Mass (in kilograms)} \times \text{Constant}}{\text{Serum Creatinine (in } \mu\text{mol/L)}} ,$$

където eC_{Cr} е изчисленият креатининов клирънс (estimate clearance creatinine); age - възрастта в години, mass - теглото в килограми; constant - величина от 1.23 за мъже и 1.04 за жени.

Съществена особеност е, че от числото 140 се изважда възрастта на изследвания пациент. При това условие един 20-годишен човек ($140-20 = 120$) ще има два пъти по-висока ГФ от един 80-годишен човек ($140-80 = 60$). В някои от вариантите на формулата се предлага използването на „идеално телесно тегло - IBW ” или „коригирано телесно тегло - $AjBW$ “, като са дадени и формули за преизчисляване на телесното тегло в идеално и в коригирано. Използването на идеално или коригирано телесно тегло без съмнение подобрява оценката за ГФ, но съществуват известни резерви за използването му при възрастни хора, при пациенти със затлъстяване и др. За възрастни се предлага и друга модификация: а/ $CrCl = [\text{телесното тегло} \times (140-$

възраст)]/0,815 x плазмения креатинин (за мъже), б/ CrCl = [телесното тегло x (140-възраст)]/0,960 x плазмения креатинин (за жени).

2. Формула MDRD. През 1999 е въведена нова формула за оценка на ГФ, а именно MDRD (Modification of Diet of Renal Disease), която проучва влиянието на белтъчната рестрикция в диетата при пациенти с бъбречни заболявания с различна етиология (112, 211):

$$eGFR=32788 \times sCr^{-1.154} \times Age^{-0.203} \times 0.742 \text{ (if Female),}$$

където Scr е серумният креатинин в $\mu\text{mol/l}$, 1.212 е коефициент за чернокож, 0.742 е коефициент за жени.

У нас се използва предимно формулата на MDRD, в която се включва креатининът, определен по Jaffe. При съпоставяне на изчисленията по формулата от MDRD и по тази на Cockcroft-Gaute (CG) (26, 174, 188) се установява, че първата дава относително по-високи резултати. Формулата на C&G е по-подходяща за възрастни пациенти с поднормено тегло и неподходяща при пациенти със затлъстяване. Формулата MDRD е почувствителна при деца. Въпреки всички известни недостатъци формулите Cockcroft-Gault и MDRD са много често използвани за изчисляване на ГФ в клиничната практика. Те са особено подходящи, когато бъбречната филтрация е стабилна. MDRD формулата дава значими отклонения при: а/ пациенти под 18 г. възраст; б/ пациенти с нестабилна концентрация на креатинина, която се среща при бременни; в/ наличие на придружаващи заболявания; г/ хоспитализирани пациенти; д/ лица с екстремна мускулна маса и диета (напр. культуристи, пациенти с ампутирани крайници, параплегия, анорексия; вегетарианци, приемащи като добавка креатин (37, 77, 112, 113). Въпреки всички тези ограничения формулата MDRD продължава да се използва по-често от формулата C&G. Освен това формулата MDRD се препоръчва при годишната оценка на всички пациенти със захарен диабет тип 2. За съжаление и двете формули са ограничени от липсата на валидиране в пълната гама на ГФ, за която те се прилагат. При използване на MDRD уравнението се стига до

надценяване на бъбречната функция при лица с намалена мускулна маса и до подценяване сред тези с ГФ > 60 ml/min/1.73 m². За намаление до минимум на някои от тези ограничения е разработена и предложена СКД-ЕРІ формулата. Някои автори твърдят, че новото уравнение дава по-точна оценка на ГФ (77, 126, 188).

3. Формула СКД-ЕРІ. В последните години се използва трета формула - СКД-ЕРІ (Chronic Kidney Disease Epidemiology (126, 198):

$$eGFR = 141 \times \min(SCr/k, 1)^a \times \max(SCr/k, 1)^{-1.209} \times 0.993^{Age} \times [1.018 \text{ if Female}] \times [1.159 \text{ if Black}],$$

където SCr е серумният креатинин в mg/dL; коефициентът „k“ е 0.7 за жени и 0.9 за мъже, коефициентът „a“ е -0.329 за жени и -0.411 за мъже; коефициентът “min“ показва минимума на SCr/k или 1, и коефициентът „max“ показва максимума на SCr/k или 1.

На този етап в нашата страна като основен маркер за оценка на бъбречна функция се препоръчва определянето на нивото на ГФ. То се пресмята на базата на уравнения, в които основна величина е серумният креатинин и като променливи задължително са включени възраст, пол и телесно тегло.

4. При деца се използва формулата на Schwartz (171 - 174, 185, 193):

$$eGFR = \frac{k \times Height}{Serum Creatinine},$$

където „k“ е константа, height е височината в см, serum creatinine е креатининът в mg/dl. Константата “k” зависи от мускулната маса, която варира в зависимост от възрастта на детето. В първата година от живота за недоносени бебета k = 0,33 [24], а за доносени k = 0,45. За бебета и деца на възраст от 1 до 12 години k = 0,55.

Един от проблемите с креатининовите уравнения за ГФ е, че методите за определяне на креатинина (Jaffe кинетични, ензимни, HPLC, IDMS) се различават по своята чувствителност и по начина на калибрация (без или със „златен стандарт“) (37, 77, 156, 167). Последни данни показват, че въпреки

стандартизация на тестове за креатинин оценката на ГФ остава относително неточна поради различия в детерминантите на креатинина, които могат да бъдат засегнати при остри и хронични заболявания (176). Тази неточност може потенциално да доведе до неправилна класификация на пациентите. Основното ограничение на креатинина е, че нивото се определя не само от ГФ, но също и от мускулната маса и от хранителния прием. Креатининът не е достатъчно надежден при пациенти с някои характеристики: напреднала възраст, женски пол, хронично заболяване със загуба на мускулна маса, ампутация, вегетарианска диета, обезитас и с леко нарушена бъбречна функция (90, 113). Авторите на използваните формули се опитват да се приспособят към тези променливи фактори и въпреки това резултатите невинаги са точни (27, 37, 176). Различни пациенти могат да имат един и същи стойности на серумния креатинин и много различна ГФ. Според Zahran и сътр. (223) при оценка на ГФ чрез креатинин може да има различни състояния на неправилно тълкуване (90, 113, 115).

Надценяване на ГФ свързано с:

- Метаболизъм на креатинина извън бъбреците при активиране на чревната бактериална креатининаза;
- Компенсаторна хиперсекреция, т.нар. „сляп креатининов кръг“ или „креатинин негативна област“, което е една от причините за надценяване на креатининовия клирънс с 15-20%;
- Слаба продукция на креатинин при хора с малка мускулна маса (дребни жени, възрастни хора) и страдащи от недोхранване (или на диета без месо);
- Прием на лекарства и/или ендогенни субстрати, повлияващи измерването на креатинина (глюкоза, витамин С, билирубин, цефалоспорици и др.).

Подценяване на ГФ е свързано с:

- Висок синтез на креатинин поради увеличена мускулна маса и прием на много белтъчини, главно месо;
- Тубуларна хипосекреция (напр. при нефрит при лупус);
- Прием на лекарства, блокиращи тубулната секреция, като триметоприн, амилорид, циметидин, спиронолактон, пробенецид триамптерен и др.;
- Екстраренално елиминиране на креатинина.

Освен това синтезът на креатинина показва до 40% циркадна вариация. Креатининът се увеличава в серума едва при 50-60% редуция на ГФ. Намалението на ГФ на креатинина увеличава неговата секреция от проксималните тубули.

От друга страна, налице са и някои предимства на креатинина:

- Той е маркер, изпитан във времето;
- Некрекъснато се подобряват методите за определянето му в кръвен серум и урина;
- Автоматизират се методите за измерването му;
- Има ниска цена;
- Подходящ е за рутинна употреба.

Формули за изчисляване на ГФ с цистатин С

През последното десетилетие за оценка на ГФ се предлага и използва и друг ендогенен биомаркер - цистатин С (4, 6, 18, 20, 25, 34, 77, 175, 178). Според свойствата си цистатин С се очаква да бъде почти идеален маркер за бъбречната филтрация. Той може да се използва за определяне на бъбречната филтрация още в първия ден от живота на новородени, които се очаква да са с проблеми. Той е не само алтернатива на всестранно използвания креатинин, но при някои пациенти има предимство.

Първоначалните данни показват, че концентрацията на цистатин С в циркулацията е постоянна. Той се филтрира свободно през гломерулите и постъпва в капсулата на Bowman, но след това се реабсорбира от гломерулния филтрат и метаболизира без да се секретира. Не показва зависимост от

мускулна маса и диета. Всичко това е предпоставка за опростяване на формулите с участието на цистатин С за оценка на ГФ.

Една от най-елементарните и често използвани формули за определяне на ГФ с цистатин С е следната (18, 36, 77, 194):

1. Проста формула за цистатин С е $\text{ГФ} = 100 : \text{серумен цистатин С в mg/l}$.

Някои автори предлагат по-сложни формули с цистатин С за изчисляване на ГФ:

2. СКД-ЕРІ за цистатин С без нагласяване на възраст, пол, раса: $\text{eGFR} = 76.7 \times \text{CysC}^{-1.19}$ (197).

3. СКД-ЕРІ за цистатин С с нагласяване за възраст, пол, раса: $\text{eGFR} = 127.7 \times \text{CysC}^{-1.17} \times \text{age}^{-0.13} \times 0.91$ (за жена)

Grubb и сътр. (67) предлагат уравнение с цистатин С за деца в пубертета:

$$\text{ГФ} [\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (1.73 \text{ m}^2)^{-1}] = 84.69 \times \text{cystatin C (mg/L)}^{-1.680} \times 1.384,$$

където детето е <14 години. Според авторите тази формула оценява ГФ еднакво добре или по-добре, отколкото с формулите MDRD, Schwartz и Counahan-Barratt при непълнолетни (20).

Надделява мнението, че изчислението на ГФ е по-точно, когато се използват формули с цистатин С, при които в изчислението се включат възраст, пол, раса и ВМІ (36, 78, 131, 144, 205). След това са предложени много различни формули за цистатин С, които Eriksen и сътр. (53) обобщават в таблица 9, представена по-долу.

Някои проучвания показват, че простата цистатин С формула може да бъде полезен инструмент за оценка на бъбречната функция в ежедневната клинична практика при пациенти с наднормено тегло, диабет и особено при амбулаторни пациенти (207). Въпреки предимствата на тази формула, уравнения базирани на цистатин С не могат напълно да заместят златния стандарт за оценка на ГФ, но могат да допринесат за една по-точна селекция на пациентите нуждаещи се от инвазивни и скъпи процедури (18, 81).

Таблица 9: Формули за определяне на ГФ с цистатин С според различните автори и методи

Формула	Автор	Метод
$(80.35/\text{cystatin C})^{-4.32}$	Hoek, 2003	PENIA
$(100/\text{cystatin C})^{-14}$	Tidman, 2008	PETIA
$79.901 \cdot \text{cystatin C}^{-1.4389}$	Flodin, 2007	PETIA
$77.24 \cdot \text{cystatin C}^{-1.2623}$	Larsson, 2004	PENIA
$66.8 \cdot \text{cystatin C}^{-1.30}$	Rule, 2006	PENIA
$86.49 \cdot \text{cystatin C}^{-1.686} \cdot (0.948 \text{ if female})$	Grubb, 2005	PETIA
$127.7 \cdot \text{cystatin C}^{-1.17} \cdot \text{age}^{-0.13} \cdot (0.91 \text{ if female}; 1.06 \text{ if black})$	Stevens, 2008	PENIA
$177.6 \cdot \text{creatinine}^{-0.65} \cdot \text{cystatin C}^{-0.57} \cdot \text{age}^{-0.20} \cdot (0.82 \text{ if female}; 1.11 \text{ if black})$	Stevens, 2008	PENIA

При оценка на ГФ с цистатин С, заслужава да се отбележат някои факти (19, 66, 106, 122, 124, 136, 205):

1. **Предимства:** а/ синтезата на цистатин С от клетките е постоянна и остава константна в различните биологични течности; б/ свободно се филтрира през бъбречните гломерули; в/ не се секретира; г/ напълно се реабсорбира и катаболизира в проксималните тубулни клетки; д/ не се влияе от фактори, като пол, възраст, мускулна маса; е/ показва ниски циркадни вариации; ж/ позитивира се при минимални бъбречни увреждания; з/ показва отчетливи промени в т.нар. “креатинин негативна област“; и/ не е известен механизъм за небъбречен клирънс; й/ леки промени в ГФ водят до отчетливи промени в нивото на цистатин С; к/ не е зависим от възпалителни процеси.

2. **Недостатъци** (19, 43, 161, 178): а/ промяна в синтезата на цистатин С при хипо- и хипертиреоидни състояния; б/ промяна в синтезата при прием на високи дози стероиди; в/ единични проучвания съобщават за влиянието на възраст, пол, тегло, ръст, пушене и възпалителни процеси; CRP (С-реактивен протеин) повлиява синтезата или катаболизъм; г/ по-висока цена при изследването на цистатин С спрямо креатинина.

Формули за изчисление на ГФ с креатинин и цистатин С

За Европа и САЩ точната оценка на ГФ е ключов въпрос за ранно откриване на ХБЗ при възрастни, деца и новородени (7, 71, 77, 80, 136, 205, 217, 223). Креатининът е с ограничена диагностична стойност, поради аналитични и физиологични причини. Самостоятелното използване на креатинина при оценка на ГФ, въпреки че има доста предимства, има и недостатъци (98, 184). Това е причина за търсене и предлагане на нови уравнения с едновременното използване на двата биомаркера за оценка на ГФ (15, 77, 197, 198). Ето някои от тях:

1. СКD-EPI с цистатин С и креатинин с нагласяване на възраст, пол, раса:

$$eGFR = 177.6 \times sCr^{-0.65} \times CysC^{-0.57} \times age^{-0.20} \times 0.80 \text{ (за жени),}$$

където age е възраст в години; фактор за превръщане на ГФ от mL/min/1.73 m² в mL/s/1.73 m² × 0.01667; SCr серумен креатинин от mg/dL за превръщане в μmol/L, × 88.4; serum CysC серумен цистатин за превръщане от mg/L в nmol/L, × 74.9.

При сравнение на клирънса с 51CrEDTA и със серумния креатинин и цистатин С изчислената ГФ със самостоятелни и комбинирани формули и анализирани ROC-криви показват разлика в оценката на точността не повече от 30% (166, 202). Поради спор относно чувствителността на двете много често използвани формули - MDRD и СКD-EPI, е проведено сравнение с 51Cr-EDTA с едно инжектиране. Креатининът се определя по Jaffe-метод, проследим спрямо IDMS и цистатин С чрез PETIA. Анализът на ГФ е проведен при 195 бели жени и мъже на възраст от 19 до 86 г. (мъжете и жените в това число са равен брой). Средната стойност на ГФ при двата пола не се различава и е 112 ± 24, като с MDRD е 94 ± 19 и със СКD-EPI - 102 ± 18 mL/min/1.73 m². Корелацията с клирънса с 51CrEDTA е r = 0.26 (P = 0.01) и r = 0.37 (P < 0.001) респективно. Прецизността, постигната с прилагането на двете уравнения, не е много добра. Има обратна корелация на възрастта с ГФ (r = -0.36, P < 0.001). Отклонението е

по-малко със СКD_EPI (табл. 10) и затова тази формула има предимство пред MDRD.

Забележка: Bias е средната разлика между измерена и прогнозна гломерулна филтрация (положително число показва подценяване); възпроизводимостта е стандартното отклонение на bias; RMSE е средната квадратична грешка; P15 и P30 са процентите на ГФ оценки в рамките на $\pm 15\%$ или $\pm 30\%$ от измерената ГФ съответно.

Таблица 10: Отклонение (Bias), точност и възпроизводимост на формулите MDRD и СКD-EPI (по Soares,188)

	MDRD	СКD-EPI	P
Bias (mL/min/1.73 m ²)	18	10	<0.001
Precision (mL/min/1.73 m ²)	26	24	<0.01
RMSE (mL/min/1.73 m ²)	32	26	<0.01
P15 (%)	40	55	<0.001
P30 (%)	69	85	<0.001

През 2012 г. Тео и сътр. (205) въз основа на голяма база данни определят валидността на самостоятелните и комбинираните нови уравнения за оценка на ГФ. При сравнението се използват стандартизиран цистатин С и стандартизиран креатинин със стандартни референтни материали. След много подробна статистическа обработка, резултатите показват, че най-добра оценка за ГФ се получава с уравнението цистатин С плюс креатинин. Възпроизводимостта и точността с това ново комбинирано уравнение се подобрява и чрез него правилно се прекласифицират 5.5% от изследвани участници.

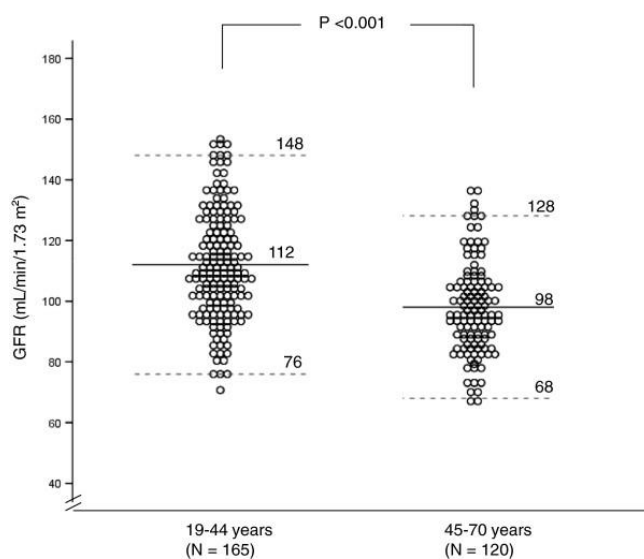
Уравнението, което съчетава креатинин и цистатин С дава най-точна и вярна оценка на ГФ в целия диапазон на ГФ и в подгрупи въз основа на демографски и клинични характеристики. Това подобрене важи дори и сред участниците с индекс на телесната маса по-малко от 20. Подобрената точност

се дължи на ГФ-детерминанти за креатинина и цистатин С. Авторите смятат, че цистатин С не трябва да замества креатинина в общата практика, обаче комбинацията на креатинина и цистатин С осигурява по-точни оценки на ГФ (223). Използването на цистатин С е необходимо за специфични цели - като тест за диагностициране на хронично бъбречно заболяване при пациенти с намалена ГФ и при съмнителни случаи с нормален креатининов клирънс (214). Цистатин С може да се използва за потвърждаване на висок риск от лоша прогноза за лица, чиято прогнозна ГФ е намалена в съответствие с креатининовото уравнение. Това значително улеснява клиничното тълкуване на цистатин С (194). С цистатин С не са регистрирани фалшиви отрицателни резултати. Той надминава по ефективност конвенционалните биомаркери. При пациенти с диабет тип 1 и с микроалбуминурия има доказателства на база изследване на ГФ чрез цистатин С за наличие на леко (цистатин С <90) или умерено (цистатин С <60 mL/min/1.73 m²) ХБЗ (159, 160, 168). При пациенти с бъбречна трансплантация цистатин С е по-чувствителен от серумния креатинин за откриване на намалена ГФ и забавена функция на присадката. Някои проучвания съобщават, че ГФ е надценена в 30% въз основа само на креатининовите уравнения. Цистатин С е по-добър за оценка на ГФ при деца (59, 106, 158, 166). През 2009 г. Schwartz (174) предлага нова формула за ГФ за деца и новородени с креатинин и цистатин С. Чрез тази нова формула се получава 87.7% от стойността, получена с йохексол. Тази формула по-точно отразява дали ХБЗ е стабилно или прогресира (174).

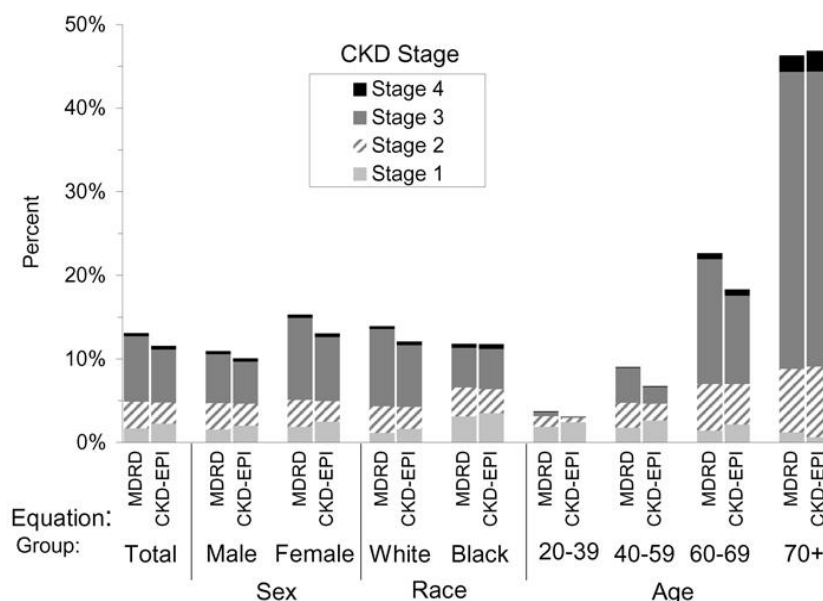
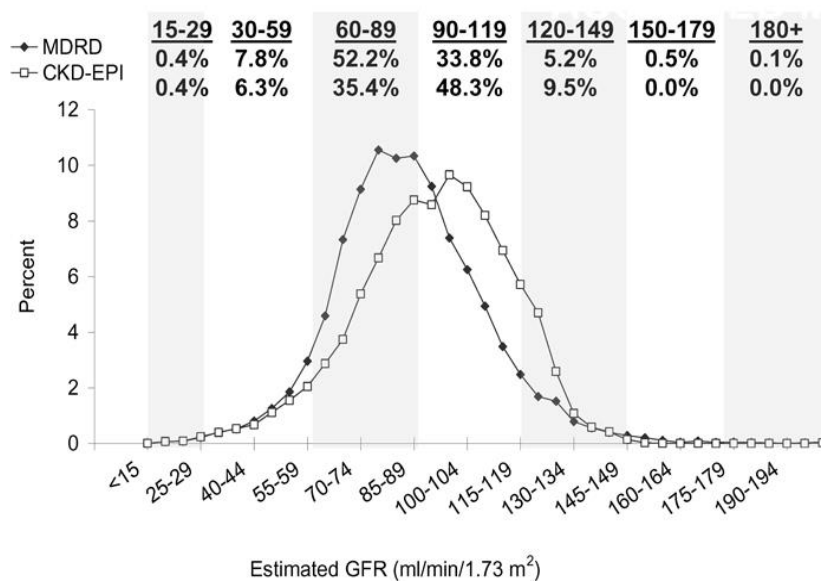
2.4.4 Референтни граници на ГФ

Референтните граници на ГФ са предмет на доста проучвания (80, 188, 189, 190, 191, 220). Най-често предлаганите стойности, коригирани за повърхността на тялото, са 100-130 ml/min/1.73 m² при мъжете и жените. При деца ГФ, измерена чрез инулиновия клирънс, е 110 ml/min/1.73 m² до 2-годишна възраст и при двата пола, след което постепенно намалява. След 40-годишна възраст ГФ намалява прогресивно с около 0.4 - 1.2 ml/min годишно.

Според повечето бъбречни фондации референтните граници варират от 90 до 120 mL/min/1.73 m². Възрастните хора имат по-ниски нормални нива на гломерулна филтрация, поради намаляване с възрастта. През 2013 г. Soares и сътр. (188) измерват ГФ чрез 51Cr-EDTA с едно впръскване. ГФ-референтните стойности са разработени в съответствие със CLSI C28 протокол. Възрастовият диапазон на изследваните 285 здрави лица е от 19 до 70 години (фиг. 11 и 12), като 57% са жени, а средната стойност на ГФ е 106 ± 18 mL/min/1.73 m². Няма значима разлика в ГФ между мъже и жени - 108 ± 18 срещу 104 ± 18 mL/min/1.73 m² съответно, при p = 0.134. ГФ-стойностите са по-ниски при пациенти на възраст ≥ 45 години в сравнение с тези, на възраст под 45 години (98 ± 15 ± 18 vs. 112 mL/min/1.73 m², P <0.001). Въз основа на средната аритметична ± 2 SD, ГФ-референтните стойности са 76 – 148 mL/min/1.73 m² за пациенти на възраст над 45 години и 68 - 128 mL/min/1.73 m² - за физически лица под 45 години, независимо от пола. Някои клинични ситуации изискват по-точна оценка на ГФ. Такива са състояния преди бъбречна трансплантация, в напреднала възраст, при тежко недохранване или затлъстяване, при заболявания на скелетната мускулатура, при параплегия и квадриплегия, вегетарианска диета и преди прилагане на продължителни курсове от някои лекарства (126, 127).



Фигура 11: Схематично представяне на ГФ, изразена като mean ± 2SD при здрави индивиди на възраст <45 г и ≥45 г. (по Soares и сътр., 188, 189).



Фигура 12: Схематично представяне на процентното разпределение на ГФ, орделена чрез формулите MDRD и CKD-EPI (с креатинин) в различни възрастови групи (по Soares и сътр., 188, 189).

В Холандия е проведено цялостното проучване на референтните стойности за ГФ за кавказката популация без изразен риск. Включени са 2823 мъже и 3274 жени на възраст от 18 до 90 години. Референтна група от видимо здрави индивиди е избрана чрез изключване на лица с установена хипертония, диабет, сърдечно-съдови и бъбречни заболявания (167, 196, 198). Групата от „зdravi“

включва 1660 мъже и 2072 жени, от които 869 от двата пола са на 65 или повече години. Средната стойност на ГФ е 85 ml/min/1.73 m² - при 30- до 34-годишни мъже, и 79 ml/min/1.73 m² - при жени на същата възраст (таблица 11, 12). Установено е, че при тези индивиди (здрави хора) ГФ намалява приблизително с 0.4 ml/min/година.

Таблица 11: Референтни стойности за ГФ на здрави мъже. Показани са 5, 25, 50, 75 и 95 персентили в различни възрасти.

Възраст (г.)	Брои	Mean ± SD	Граници	P5	P25	P50	P75	P95
18–24	94	100±13	72–137	77	90	99	109	121
25–29	96	93±13	67–125	74	82	90	102	117
30–34	118	86±13	63–133	68	77	85	93	107
35–39	125	85±14	61–118	65	74	85	95	110
40–44	143	84±13	54–124	66	76	83	92	106
45–49	160	83±13	50–123	63	73	82	91	105
50–54	143	79±12	46–120	60	71	78	87	97
55–59	158	76±13	27–118	58	68	75	84	98
60–64	149	75±15	48–199	59	67	73	83	95
65–69	154	75±14	51–165	56	66	74	82	97
70–74	102	71±12	38–102	54	64	70	79	92
75–79	112	70±13	41–110	45	62	70	79	91
80–84	73	67±15	41–129	43	58	69	77	87
>85	33	62±16	34–101	35	47	65	72	92

Таблица 12: Референтни стойности за еГФ за здрави жени. Показани са 5, 25, 50, 75 и 95 персантили в различни възрасти.

Възраст (г.)	Брой	Mean ± SD	Range	P5	P25	P50	P75	P95
18–24	7	—	84–142	—	—	102	—	—
25–29	15	81 ± 9	65–101	65	73	83	85	101
30–34	33	79 ± 16	39–127	60	72	78	86	111
35–39	50	77 ± 12	51–113	58	68	76	83	92
40–44	43	79 ± 17	57–159	64	70	75	86	102
45–49	60	70 ± 15	5–90	52	64	70	78	87
50–54	101	72 ± 11	42–100	56	63	71	80	93
55–59	106	70 ± 12	28–98	51	62	70	77	91
60–64	141	67 ± 12	27–98	48	61	67	75	86
65–69	154	63 ± 14	23–111	42	53	63	72	88
70–74	166	61 ± 12	16–94	43	53	62	70	79
75–79	131	59 ± 14	26–97	36	50	59	69	86
80–84	100	56 ± 15	26–91	29	46	55	65	82
>85	95	55 ± 15	21–95	29	45	53	64	82

2.4.5 Нова класификация на ХБЗ съгласно препоръките на NKF и KDOQI от 2012-2013 г.

Новата класификация на ХБЗ (35, 40, 49, 92, 93, 125, 164, 165, 195, 208) е триизмерна и включва задължително причина, ГФ и албуминурия (cause, glomerular filtration rate, albuminuria) “С, G, А”. Така по-целия свят класифицирането на ХБЗ трябва да се основава на едни и същи принципи. За ХБН се приема състояние на ГФ < 60 ml/min/1.73 m² (степен III) и наличие на белтък в урината в продължение на поне три месеца. Различни кръвни изследвания, ядрено-магнитен резонанс, рентген, скенер и ултразвук могат да помогнат за откриване на бъбречно заболяване в по-ранен етап.

Рискът от ХБЗ се увеличава с възрастта. Хората над 65-годишна възраст са по-склонни да развият ХБЗ в сравнение с хората, принадлежащи към възрастовата група 45 – 65 години. Ето защо

възрастни граждани, особено тези с диабет, трябва рутинно да контролират бъбречната си функция. Петте етапа на ХБЗ бавно прогресират от леко до умерено и до сериозно намаляване на ГФ. Колкото по-ниска е ГФ и по-изразена е албуминурията, толкова по-напреднало е ХБЗ. Етапите на ХБЗ могат да бъдат характеризирани по следния начин (16, 92, 93, 125, 164, 165):

а/ Степен I (G1) е с ГФ ≥ 90 mL/min/1.73 m² и албумин в урината (A1) - нормален или леко увеличен и без наличие на клинични симптоми за бъбречно заболяване; пациентите остават в това състояние за неопределено време или преминават към втория етап;

б/ Степен II (G2) е с ГФ 60 - 89 mL/min/1.73 m² и лека албуминурия (A1-A2); симптоми липсват или са едва набелязани; лечението е лесно и забавя прогресията на ХБЗ. Бъбреците са с леко понижение на ГФ. Повечето пациенти не знаят, че са в този етап. Много често този етап се открива случайно по повод тестване за диабет или хипертония. Установява се леко увеличение на креатинина и/или на уреята в кръвта и албуминурия и/или кръв в урината. Нормално с урината се отделя под 5 μ g/min албумин, а на този етап отделеният албумин стига до 200 μ g/min. При добър контрол на диабета и хипертонията състоянието може да се остане на този етап без прогресия;

в/ Степен III (G3) се разделя на две подстепенни: степен IIIa (G3a) - с леко до умерено намалена ГФ (45-59 mL/min/1.73 m²) и умерена албуминурия (A2); степен IIIb (G3b) - с умерено до силно намалена ГФ (30-44 mL/min/1.73 m²) и умерена до тежка албуминурия (A3). Появяват се симптоми, като постоянна умора, пенеста урина, промяна в цвета на урината, трудно заспиване и оток по краката, ръцете и очите поради задържане на вода. Появяват се усложнения на бъбречното заболяване като хипертония, анемия, отоци по тялото и начало на костно заболяване. Хиперкреатининемията и хиперуремията могат да доведат до „уремия“.

Цветът на урината се променя, белтъкът се увеличава, хематурията е честа;

г/ Степен IV (G4) е със силно намалена ГФ (15-29 mL/min/1.73 m²) и тежка албуминурия. Пациентите са в напреднал стадий. Симптомите са силно изразени: лош дъх поради повишена урея в кръвта, загуба на апетит, гадене, повръщане, безсъние, мравучкане или изтръпване на пръстите на ръцете, мускулни крампи, олигоурия и други. Промените в кръвта и урината се засилват в сравнение с промените, съпътстващи етап III. Уремията е постоянна и изостенурията е честа. Това е тежко ХБЗ, което изисква насочване към диализа или трансплантация;

д/ Степен V (G5) е с много силно намалена ГФ (<15 mL/min/1.73 m²) и много силно изразена албуминурия. Бъбречната функция е много сериозно намалена и се наблюдава терминална бъбречна недостатъчност (ТБН). На този етап бъбреците почти спират да работят. Пациентите се нуждаят от диализа или бъбречна трансплантация, за да живеят.

2.4.6 Сравнение на цистатин С с креатинина за оценка на ГФ

Изследването на ГФ се препоръчва, както за пациенти с ХБЗ, така и за хора с риск от това заболяване поради диабет, наличие на фамилна анамнеза за бъбречно заболяване, чести инфекции на пикочните пътища, сърдечно заболяване, високо кръвно налягане, блокаж на пикочните пътища, хиперлипидемия, обезитас и други (15, 108, 109, 129, 130, 165, 214). Очаквано оценката на ГФ въз основа на серумния креатинин понастоящем е широко използван метод и в повечето случаи това е достатъчно за вземането на клинично решение. Креатининът обаче е недостатъчно сигурен биомаркер поради зависимостта му от тубулната секреция, пола, възрастта, мускулната маса, физическата активност и диетата и затова той не е директно свързан с гломерулната филтрация.

Ендогенният креатининов клирънс се доближава до ГФ и затова рутинно се използва в клиничната практика (166, 167). Уравненията, базирани на креатинина, трябва да се използват с повишено внимание, особено при пациенти в най-ранните етапи на ХБЗ, с кахексия и чернодробна цироза. Освен това креатининовият клирънс може да изисква събиране на урина през определен период - 24, 12 или 6 часа, за да се определят по-точно концентрацията на екскретирания креатинин и точното количество урина за минута. Базираните на цистатин уравнения са по-добър показател от креатинина при пациенти с нараняване на гръбначния стълб, цироза на черния дроб, диабет, леко до умерено увредена бъбречна функция, както и при пациенти в напреднала възраст (48, 106, 110, 136, 150, 158, 188, 195, 205).

Няколко големи проучвания наскоро показват ползата от тестването на цистатин С самостоятелно или в комбинация с креатинина (7, 15, 111, 112, 192, 194, 198, 205, 219). При проследяване на над 26 хиляди възрастни пациенти, наблюдавани в продължение на 7 години за риск от ХБН и инсулт, се установяват интересни данни. При лицата с повишен серумен цистатин С и нормален индекс албумин/креатинин в урината при изходно ниво темповете на последващо развитие на ХБЗ се оказват по-бързи. Тази комбинация е много по-добра от изследването на албумина и креатинина в урината. Пациенти, при които едновременно е повишено нивото на креатинина и цистатин С, също имат повишен риск от ХБН в сравнение с тези, при които е използван само един от маркерите. Авторите стигат до заключението, че комбинираното увеличение на трите маркера (индекс албумин/креатинин в урината, креатинин и цистатин в серума) най-добре класифицира пациентите с ХБЗ. Хората с нормална ГФ по MDRD-уравнението, но с повишено ниво на серумния цистатин С са се оказали с два пъти по-висок риск от смъртност, като се има предвид 7-годишният период на проучването. Увеличението е три пъти, ако

успоредно е налице и увеличен индекс албумин/креатинина в урината. Смъртността е най-висока при хора с повишен креатинин, цистатин С и индекса албумин/ креатинин в урината (5, 6 пъти по-висока честота, отколкото при лица, при които и трите критерия са нормални) (114, 136, 158, 196, 197, 198). В друго проучване се установява, че увеличеният серумен цистатин С прогнозира всички причини за смъртност и сърдечно-съдови заболявания за разлика от креатинина (116). Освен това цистатин С е много по-силен предиктор за бъдеща бъбречна недостатъчност, отколкото креатининът. Увеличение на креатинина едновременно с цистатин С посочва риска от бъбречна недостатъчност в много по-голяма степен. Цистатин С е особено добър за идентифицирането на лица, изложени на риск от прогресия на хронична бъбречна недостатъчност, както и за бъдещи сърдечно-съдови инциденти и дори смъртност (48). Цистатин С може да предскаже влошаване на бъбречната функция дори когато ГФ всъщност е близа до референтната граница. Той е по-добър предиктор за смъртност от креатинина при възрастните хора, както сочи проучване, проведено сред населението в САЩ. Пациенти с ГФ $<30 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, установена чрез формулата MDRD, са сериозно застрашени да развият тежка недостатъчност, но при пациентите с по-незначително намаление (45 до $90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$) прогностичната стойност на ГФ е ограничена - особено когато отсъства албуминурия. Оценката на ГФ с креатинина ограничава полезността за пациенти с леко намалена ГФ и без протеинурия. Според проучвания на Stevens и сътр. (194) при изследване на 3418 индивиди с ХБЗ цистатин С предлага само леко подобрене по отношение на точността в сравнение с креатинина. Цистатин С е относително стабилен протеин в серум и хепаринизирана плазма и затова е обещаващ маркер за ГФ. Въпреки това става ясно, че връзката между цистатин С и ГФ може да зависи и от клиничната картина. Фактори влияещи върху цистатин С нивата са тези,

които влияят на скоростта на синтез на протеина. Такива са състоянието на щитовидната жлеза и използването на стероиди (19, 161). Независимо от това натрупаните доказателства предполагат, че цистатин С е полезен биомаркер за бъбречната функция и дори може да бъде метод на избор в различни клинични ситуации – например при диабетици и критично болни пациенти (192, 214).

2.5 Биомаркери за оценка на увреждането на бъбреците

2.5.1 Общи данни

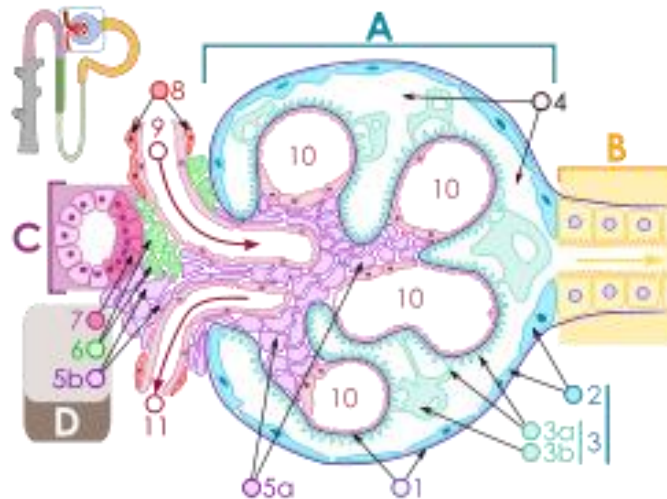
Представените дотук литературни данни ясно посочват, че ГФ, определена чрез креатинин или цистатин С или едновременно с двата показателя, е най-добрият индекс за оценка на бъбречната функция. ГФ е биомаркер с: а/ висока специфичност; б/ ниска вариабилност; в/ рядка регресия. През 2002 г. ХБЗ се класифицират на 5 етапа, базирани главно на оценката за ГФ (93). Десет години по-късно тази класификация е подложена на критика, защото не включва информация за наличието и тежестта на албуминурията, респ. протеинурията - важни биомаркери за ХБЗ. Затова през 2013 г. KDIGO, NKDEP, NKF и IFCC препоръчват **нови „златни“ правила за диагностициране на ХБЗ за унифициране в целия свят (92, 141, 145, 209), причина, ГФ и албуминурия.** От лабораторните биомаркери се включват ГФ (оценена чрез креатинин плус цистатин С) и албуминурия, защото те осигуряват ключова информация за ранно откриване, профилактика, лечение и прогресия на ХБЗ. Двата показателя не се променят едновременно и успоредно и не са еквивалентни. Това налага съвместното им използване. Защо е толкова важно при диагностицирането на ХБЗ да бъде включена албуминурията, респ. протеинурията. Според проучване от 2012 г. само 25% от американците с

протеинурия демонстрират намалена ГФ ($<60 \text{ mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$). Подобен процент от пациентите с ниско ГФ имат протеинурия. Това налага ГФ и протеинурията да бъдат използвани заедно за по-добро идентифициране на лицата с висок риск и болни с ХБЗ (2, 41, 127, 154). Пациенти с едновременно намалена ГФ и албуминурия показват по-висок риск от тези, при които е налице една или нито една от двете характеристики.

2.5.2 Протеинурия

Препоръката на KDIGO, NKDEP, NKF и IFCC е на първо място да се използва албуминурията, а след това протеинурията (92). В исторически аспект протеинурията се изследва, като показател от много дълго време. Тя е описана, като маркер за увреждане на бъбреците преди повече от век и половина от Richard Bright. Още тогава той отбелязва, че тя е показател за състоянието на бъбреците и фактор за прогресия на ХБЗ. Последните години патогенезата на протеинурията усилено се проучва (2, 3, 226). Анатомичен субстрат на протеинурията е кръвно-бъбречната бариера (КББ) респ. Bowman-овата капсула. Тя е високо селективна и високо рестриктивна. Основна нейна част е гломерулната бариера (фиг 13).

Гломерулната бариера се състои от три слоя (фенестриран ендотел, гломерулна базална мембрана (ГБМ) и подоцити (19, 20). Тези три слоя формират селективен и електростатичен филтър. Електростатичната бариера се състои от отрицателно заредени сиалопроотеини. При гломерулната протеинурия има функционални и структурни промени в бариерата. Нов етап в разбирането на протеинурията е т. нар. **slit diaphragm (SD)** или „филтърна мембрана“. Тя се формира на мястото на свързването на подоцитите с гломерулната мембрана.



Фигура 13: Схематично представяне на кръвно-бъбречната бариера (КББ) с ендотелни клетки, гломерулна базална мембраба и подоцити. (Капсулата на Bowman (A, 2-3) - в синьо; гломерули и техните капилляри - в розово с аферентна артериола (9), през капиллярите (10) и еферентна артериола (11), (по 220).

Подоцитите или висцералните епителни клетки със своите израстъци се увиват около гломерулните капилляри, при което между тях остават цепнатини, които оформят тази мембрана с участието и на определени белтъци. Откритият наскоро адхезионен трансмембранен **белтък нефрин**, синтезиран от подоцитите, играе основна роля на свързващ протеин във филтърната мембрана. Той е структурен компонент на тази мембрана, необходим за правилното функциониране на бъбречната бариерна филтрация (18, 24, 145, 226). Освен нефрина, напоследък са открити и други протеини, необходими за увиването около капиллярите – подоцин, CD2, актин-4, $\alpha 3\beta 1$ integrin, WT1, PLCE1, Lmx1b, MYH9 и други, които участват в изграждането и функционирането на slit diaphragm-ата и гломерулната протеинурия. Липсата или намалената синтеза на всеки един от тези белтъци води до различна по степен протеинурия. Когато бебетата се раждат с някои дефекти в тези протеини като нефрин и CD2AP, бъбреците не могат да функционират добре. Хората имат вариации в тези протеини и някои промени може да ги предразположат към развитие на бъбречна недостатъчност по-късно в

живота. Филтърната мембрана действа на принципа на ултрафилтрация. Тя пропуска свободно вода, соли, глюкоза, урея и белтъци с малка молекулна маса (МММ), като β 2-microglobulin (β 2-М), α 1-microglobulin (α 1-М), lysozyme, пептидни хормони, инсулин и други. Над 95% от филтрираните компоненти в това число и протеини се реабсорбират в проксималните тубули. Към окончателната урина се прибавят белтъци от тубулите, уретера, пикочния мехур и уретрата. И така не само гломерулна ендотелни клетки и гломерулната базална мембрана, но също и гломерулните подоцити с белтъци, изграждащи цитоскелетона им и тяхната филтърна мембрана, играят важна роля в патогенезата на нормалната и патологичната гломерулна протеинурия. При нормално здравословно състояние белтъците в урината, в това число албумин и МММ глобулини, са в незначителни количества, макар наскоро чрез протеомния анализ да са идентифицирани над 1500 различни белтъци. Почти половината от протеините в нормална урина имат тъканен произход и това са т. нар. **Tamm-Horsfall**-протеини. Те произхождат главно от Henle-евата бримка и дисталните тубули (2, 209, 220, 226). **Tamm-Horsfall** протеинът (ТНР) е гликопротеин, известен още като **uromodulin**, кодиран от гена UMOD. В урината при определени условия може да се екскретира до 150 mg/day uromodulin, който със сухите тест-ленти да се отчете като следи (3). Този протеин не се среща в кръвната плазма. Нормално мономерна молекула на този протеин е с МММ, но в урината физиологично присъства в много големи агрегати. Когато този протеин се концентрира при ниско рН, се образува гел. Освен уромодулина и **nephrocalcin** са гликопротеини, които влияят върху образуването на **калциеви камъни** в бъбреците. При мултиплен миелом в урината освен леки вериги на имуноглобулини често се съдържат и Tamm-Horsfall-протеини. Значителна част от белтъци в урината имат плазмен произход - albumin, tryptophan-rich prealbumin, alpha (1)-acid

glycoprotein, alpha (1)-antitrypsin, ceruloplasmin, haptoglobin, Gc-globulin, transferrin, hemopexin, beta (2)-glycoprotein I, N-acetyl- β -D-glucosaminidase and β_2 -microglobulin, IgA, IgG и други (2, 145, 209). Наличието на необичайни количества или видове белтък в урината може да насочва към: а/ системно заболяване, което води до невъзможност на бъбреците да абсорбират определени протеини през тубулите; б/ свръхпроизводството на плазмени протеини, които са в състояние да преминат през ГБМ и надхвърлят капацитета на проксималните тубули да ги реабсорбират; в/ дефект на филтърната гломерулна мембрана, която позволява да преминат необичайни количества протеини (Lerma E., 2012, NKF 2013). Протеинурията е ранен чувствителен маркер за увреждане на бъбреците при много видове ХБЗ. Тя е показател за процесите в нефрона - гломерулна филтрация, тубулна реабсорбция, секреция и гломерулна хемодинамика. При здрави хора и хора в покой отделените с урината белтъци (нормопротеинурия) са малко и тест-лентичките за общ белтък (ОБ) са отрицателни (табл. 13) (145, 226). На ден човек нормално екскретира 30-130 mg/24 часа протеини или < 150 mg/d или <300 mg/ или от 23 до 100 mg/mmol креатинин. Приетата нормална средната стойност за общ белтък в урината е около 50 mg/ L. Концентрацията на протеини в произволна проба от урина е 0-80 mg/L. Основно това са плазмен албумин (40%), имуноглобулинови фрагменти (15%), други плазмени протеини (5%) и тъканни протеини (40%). Когато има увеличена концентрация на екскретиране на серумни протеини с урината, се говори за протеинурия или хиперпротеинурия. Тогава ОБ в урината е > 150 mg/24h и качествените тестове за ОБ се позитивират. При здрави хора концентрацията на ОБ е функция на пола, възрастта, физическата активност, расата и т. н. Основните механизми за протеинурия са: а/ заболяване на гломерулите (намален брой, увеличена филтрация поради повишен пермеабилитет); б/ хиперпротеинемия при моноклонални

гамопатии (т. нар. протеинурия от препълване); в/ слаба реабсорбция на протеини от проксималните тубули (синдром на Fanconi). Алтернатива на концентрацията на ОБ в урината може да бъде креатининът и по-специално - съотношението протеини/креатинин или ОБ/креатинин (СПК, СОБК, PCR). През 2005 г. UK CKD guidelines препоръчват използването на PCR, като по-добър маркер от количествено определяне на ОБ в 24-часова урина (220). За протеинурия се говори при ACR >30 mg/mmol и PCR >50 mg/mmol. Нормално PCR е < 45 mg/mmol, което е еквивалентно на ACR < 30 mg/mmol. При стойност на PCR над 100 mg/mmol протеинурията се приема за тежка. Протеинурията може да бъде доброкачествено състояние, симптом на бъбречно заболяване или системно нарушение. Доброкачествената протеинурия може да бъде временна или ортостатична.

Таблица 13: Връзка между тестовете за полуколичествено определяне на ОБ и приблизителната концентрация в mg/dl и дневната екскреция (по 22)

Protein dipstick grading		
Designation	Approx. amount	
	Concentration ^[6]	Daily ^[7]
Trace	5–20 mg/dL	
1+	30 mg/dL	Less than 0.5 g/day
2+	100 mg/dL	0.5–1 g/day
3+	300 mg/dL	1–2 g/day
4+	More than 2000 mg/dL	More than 2 g/day
Protein dipstick grading		
Designation	Approx. amount	
	Concentration ^[6]	Daily ^[7]
Trace	5–20 mg/dL	
1+	30 mg/dL	Less than 0.5 g/day
2+	100 mg/dL	0.5–1 g/day
3+	300 mg/dL	1–2 g/day
4+	More than 2000 mg/dL	More than 2 g/day

Гломерулната и тубулната протеинурия са основните механизми при деца и възрастни. Протеинурия може да се получи от повишен пермеабилитет на гломерулната мембрана поради увреждане целостта на трипластовия филтър, намаляване брой на функциониращите нефрони и други. Тубулната протеинурия се среща при повишена екскреция на нормално филтрирани МММ-протеини поради нарушената им реабсорбция от проксималните тубули. Секреторна протеинурия се среща при повишена секреция на Tamm-Horsfall-протеини, особено при интерстициален нефрит. Протеинурия се наблюдава и когато плазмените концентрации на МММ-протеини надвишават капацитета на каналчета да реабсорбират съответните белтъци (напр. при интраваскуларна хемолиза, хемоглобинурия и миоглобинурия при рабдомиолиза). Протеинурията може да бъде разделена на три категории (69, 209): а/ **транзитна**, която преминава без третиране и може да е резултат на фибрилитет, стрес, тежко физическо натоварване и други; тя обикновено е под 1g/day; б/ **ортостатична**, която се явява при продължително стоене в изправено положение и се среща при 2 до 5% от по-слабите юноши и изчезва след 30-годишна възраст. Причината остава неясна. Тя изисква изследване на две порции урина - при продължително стоене в изправено положение, при което ОБ се позитивира, и след сън в продължение на 6-8 часа, при което тестът за ОБ е отрицателен; в/ **постоянна**, която се дължи на бъбречни заболявания, ССЗ, гамопатии и други. Тя е над 500 mg/day и често е придружена с хипоалбуминемия, едем, хипертония, хиперлипидемия и други. Основно тук се включва **гломерулната протеинурия**, която зависи от молекулното тегло, размера, формата, електрическия заряд на молекулите и бъбречната хемодинамика. Гломеруларната протеинурия е манифестация на нарушена гломерулна базална мембрана. Продължава да се доуточнява кой от трите слоя на ГБМ и кои от белтъците на филтърната мембрана (slit diaphragm) играят

най-съществена роля. Прагът за пермеабилитет на протеини през ГБМ е приблизително до 30 000 kDa, въпреки че има някои допълнителни пречки за отрицателно заредени молекули, дължащи се на отрицателен заряд на базалната мембрана и подоцитите. Процесът на филтруване на кръв през капсулата на Bowman е с нормална скорост 125 ml/min, което се равнява на около 80-кратно филтриране на кръвния обем дневно. Намален приток на кръв към гломерулите при застойна сърдечна недостатъчност води до лека протеинурия, а увреждането на гломерулите е свързано със значителна и тежка протеинурия, състояща се предимно от албумин. Повишена екскреция на МММ-протеини (хемоглобин, миоглобин, Венте- Jones протеини) дава също изразена протеинурия известна, като тубулна или протеинурия поради намален резорбтивен капацитет. При възпаление и кървене в репродуктивния тракт и пикочните пътища се явява протеинурия поради пренос на плазмени белтъци. Според количеството на отделения за 24 часа ОБ се различават **лека, умерена и изразена (масивна) протеинурия**. Според съотношението между нискомолекулните и високомолекулните белтъци протеинурията бива **селективна и неселективна**. Протеинурията е не само важен биомаркер за идентифициране увреждането на бъбреците. Тя е и важен фактор за развитието на ХБЗ. Отделни видове белтъци, самостоятелно или заедно с други протеини, също увреждат бариерната филтрационна мембрана. Основните **предимства** на изследването на ОБ се свеждат до това, че той е:

- а/ Добре познат биомаркер от дълго време;
- б/ Широко използван в практиката;
- в/ Достъпен и евтин показател;
- г/ Показател, който дава възможност за качествено и количествено определяне.

Основните **недостатъци** при определяне на протеинурията са:

- а/ Силна интерференция;
- б/ Липса на идентификация на отделните белтъци;
- в/ Вариабилност.

Напоследък все по-често се предлага определянето на РСР вместо на количеството на ОБ. Този маркер само в известна степен елиминира посочените недостатъци на определянето на ОБ. Всичко това е причина за търсене на друг протеинов биомаркер (69, 87).

2.5.3 Албуминурия

Преди повече от 30 години, като протеинов биомаркер е предложен **албуминът** (2, 41, 52, 76, 127). Последният се синтезира само в черния дроб, състои се от 585 аминокиселини и е с молекулна маса 66,473. Албуминът има 17 дисулфидни моста, 4 домена и свързва много лиганди, включително мастни киселини, билирубин, калций, магнезий и други. Известна част (<10%) от N-и C-терминалите са гликирани, като количеството им при диабетици значително се увеличава. Патогенезата на албуминурията се обсъжда на молекулярно ниво и е известно, че хипергликемията, оксидативният и механичният стрес, възпалителните отговори и други активират интрацелуларните сигнални пътища; настъпват промени в растежните фактори, цитокините, холестерола, триглицеридите и възпалителните медиатори; следва акумулация на интрацелуларния матрикс с увеличена продукция и намалена деградация, което води като резултат до гломерулосклероза с албуминурия и протеинурия. Обсъжда се и загубата на протеогликани в ГБМ, както и намаление на броя и плътността на подоцитите поради засилена апоптоза. Албуминът в урината е изложен на по-широк интервал от рН и йонна сила, отколкото в плазмата. Албуминът в урината може да бъде модифициран под влияние на висока концентрация на урея, глюкоза, аскорбат и други.

Определянето на албумина има редица **предимства** пред това на ОБ (41, 127, 226): а/ той е хомогенен компонент; б/ филтрацията му през ГБМ е добре установена; в/ методите за определянето му, особено имунологичните, са високо специфични и чувствителни. Албуминът не е еквивалентен на ГФ и е независим фактор за оценка на увреждането на бъбреците при диабет и при други нефропатии (70, 92, 145, 164, 165, 203, 214, 224). Албуминурията и ГФ трябва да се оценяват, като маркери за прогресия на ХБЗ. Промените в албуминурията са променливи, а промените в GFR обикновено са прогресивни. Спадът в ГФ обикновено е съпроводен от нарастване на албуминурията (KDIGO, 2012 г.). Нормално концентрацията на албумина в урината е по-малко от 5 mg/l. Когато се изразява като скорост на екскреция на албумина (UAER), тази концентрация е 2.6-12.6 $\mu\text{g}/\text{min}$ - при мъжете, и 1.1-21.9 $\mu\text{g}/\text{min}$ - при жените, или <30 mg/d, или <20 mg/l (табл. 14-15). Нормалната средната стойност на албумина при възрастни е около **10 mg/24h**.

Албуминът в урината се увеличава с някои физиологични променливи, каквито са например изправената поза, усиленото физическо натоварване, бременността, фибрилитетът и други. Албуминурията е добре познат маркер за прогнозиране увреждането на бъбреците при пациенти с диабет тип 2 и при есенциална хипертония и предиктор на ССЗ при тези популации. Има данни, че редукцията на албуминурията води до намаляване на риска от нежелани бъбречни и сърдечно-съдови събития. Албуминурията съдържа 20-70% от екскрецията на протеини с урината. Измерване на албумин в урината чрез сухи тестове, без едновременно измерване на креатинин е предмет на фалшиво негативни и фалшиво положителни резултати, дължащи се на промени в уринната концентрация, причинени от хидратацията. Албуминурията може да бъде измерена по различни начини:

- В 24-часова урина;

- В сутрешна или случайна урина;
- Чрез определяне на съотношението албумин/креатинин.

а/ **Микроалбуминурия (МА)** или умерена албуминурия (А2);

Микроалбуминурията е определена за първи път от Mogensen, 1981 г. (41, 72, 76, 88, 218). Тя е най-ранната откриваема аномалност при диабетна гломерулопатия. При МА албуминът в урината е над нормалната граница, но под нивото на откриване чрез тест-ленти за ОБ. Повечето от тест-лентите откриват до 90% от албумина и са слабо чувствителни за другите видове белтъци в урината. Сулфосалициловата киселина в разтвор от 20% преципитира много повече белтъци в урината, отколкото откриват сухите тестове.

Преди повече от 30 години микроалбуминурията е въведена като биомаркер за диабетна нефропатия (41, 72, 87, 88). Като основен метод за микроалбуминурията се прилага количествено определяне на албумина в 24-часова урина. Оттогава досега това изследване играе важна роля в оценката на степента на засегнатост на бъбреците при диабетици тип 1 и 2, хипертоници, сърдечно-съдови заболявания (ССЗ), метаболитен синдром, обезитас и други, както и за успешното им третиране. **Референтните граници за микроалбуминурията са 30-300 mg/24h или 20 – 200 mg/l** (табл. 14). Микроалбуминурията е независим маркер за бъбречни и сърдечно-съдови усложнения при пациенти с диабет и първична хипертония, за повишен риск от смърт при диабетици и недиабетици и е по-силен индикатор от кръвното налягане и хиперхолестеролемията.

За установяване на микроалбуминурия се използват специфични тест-ленти (Albusure and Albustix). Тези методи са особено подходящи за скрининг. За количествено определяне на микроалбуминурията се използват колориметрични и главно имунологични методи (турбидиметрия и нефелометрия).

б/ Макроалбуминурия или тежка албуминурия (А3), при която албуминът в урината е > 300 mg/24h или >200 mg/l (табл. 14) (145, 164).

Тя се наблюдава много по-рядко от микроалбуминурията. Пациентите с увредена бъбречна функция или макроалбуминурия са изложени на риск от ТБН, сърдечно-съдова заболеваемост и смъртност. Скринингът за макроалбуминурия е по-добра стратегия от тази за намалена ГФ да се идентифицират лицата, които са изложени на риск от ТБН.

Около 8% от възрастните имат микроалбуминурия (т.е. отделят от 30 до 300 мг албумин за 24 часа) и 1% имат макроалбуминурия (т.е. отделят повече от 300 мг на албумин за 24 часа). Албуминурия е била открита при един от всеки трима души с диабет, при един от всеки седем души с високо кръвно налягане, но без диабет и при един от всеки шест души по-възрастни от 60 години. (Тези статистически данни са от проучване на NHANES).

Таблица 14: Cut off стойности за нормо-, микро- и макроалбуминурия (по 92)

	24-h	Сутрешна	Случайна урина	
	UAE (mg/24-h)	AER (μ g/min)	UAC (mg/L)	ACR (mg/g) (за мъже и жени)
Normoalbuminuria	<30	<20	<20	<30
Microalbuminuria	30-300	20-200	20-200	30-300
Macroalbuminuria	>300	>200	>200	>300

2.5.4 Съотношение албумин/креатинин (ACR)

Определянето на микроалбуминурията е свързано с редица ограничения поради интраиндивидулни разлики между пациентите по отношение на фактори, като ниво на физическа активност, наличие на остро заболяване или треска, състояние на менструация, бременност, при вагинално течение, диета, високо кръвно налягане, степен на

гликемичния контрол и приложен метод за събиране на урината (например, 24-часова, сутрешна, краткосрочна или случайна урина).

Като цяло албуминът в урината е около 25% по-висок през деня, отколкото през нощта. Затова през последното десетилетие все по-често се предлагат нови подобрени показатели, каквито са съотношението албумин:креатинин (САК, АСР, UACR), съотношението ОБ:креатинин (СОБК, РСР, UPCR), скоростта на албуминовата екскреция (АЕР, UАЕР) и скоростта на екскреция на ОБ (СЕОБ, РЕР, UPER) (87, 88, 104, 216). АСР е показател за 24-часовото излъчване на албумин с урината. При определянето му не се налага събиране на 4-, 6-, 12- и 24-часова урина. Албуминът не се влияе от това дали урината е разрежена или концентрирана (за разлика от тестовете за албумин). За определяне на АСР и РСР се използват **сутрешна** или случайна **еднократна** порция урина.

Според NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence) АСР трябва да се използва с предимство пред други тестове на протеинурия, защото е с по-голяма чувствителност за откриване на пониско, но клинично значимо ниво на албуминурията респ. протеинурията (92, 145). Проведените сравнителни проучвания на микроалбуминурията в 24-часова урина и АСР в сутрешна урина, доказват, че АСР е удобен, икономически ефективен и ефикасен тест за скрининг на пациенти с микроалбуминурия. АСР се използва широко, за да се определи наличието на микроалбуминурия и дори е използван, като „**златен**“ стандарт при установяване на ефикасността на други диагностични тестове. Многобройни проучвания документират съответствие в резултатите на АСР в еднократна порция урина с резултатите в 24-часова урина ($R = 0,96$). **Референтните стойности за АСР са $\geq 3.5 \text{ mg/mmol}$ (за жени) и $\geq 2.5 \text{ mg/mmol}$ (за мъже) и за АЕР $< 20 \text{ }\mu\text{g/min}$ или $< 20 \text{ mg/l}$** (табл. 15). Когато се измерва като маса, АСР е между 30 и 300 μg

албумин/mg креатинин. Протеинурията се определя, като $ACR > 30\text{mg}/\text{mmol}$ или албуминова концентрация $> 200\text{ mg}/\text{l}$, което е еквивалентно на съотношението протеин/креатинин $50\text{ mg}/\text{mmol}$ креатинин или екскреция на общ белтък $0.5\text{ g}/24\text{ h}$ и $ACR\ 70\text{ mg}/\text{mmol} = PCR\ 100\text{ mg}/\text{mmol} = ОБ\ 1\text{ g}/24\text{ h}$). ACR има предимство пред PCR, тъй като е по-чувствителен, особено за по-ниските нива на протеинурия.

PCR може да се използва като алтернатива на ACR. PCR е приемлив, ако ACR е висока (> 500). $ACR\ 30\text{ mg}/\text{mmol} = PCR\ 50\text{ mg}/\text{mmol} = UPER\ 0.5\text{ g}/24\text{ h}$. Някои автори (87, 104, 216) смятат, че ACR за откриване на микроалбуминурия не отразява разликата в креатининовата концентрация между мъже и жени. Според тях албуминовата концентрация е почти идентична при двата пола, креатининът, обаче е значимо по-висок при мъжете ($p < 0.001$) (8, 10). Затова те приемат за референтна стойност на $ACR \geq 30\ \mu\text{g}/\text{mg}$ и за полово специфична разграничителна точка (cutpoints) $\geq 17\ \mu\text{g}/\text{mg}$ при мъже и $\geq 25\ \mu\text{g}/\text{mg}$ при жени. Когато се използва една стойност за ACR, нивото на албуминурията е по-ниско при мъжете в сравнение с нивото ѝ при жените.

Наскоро обаче Американската диабетна асоциация (ADA) Националната бъбречна федерация (NKF) и NKDEP/IFCC (92, 93, 141, 157, 216) предлагат използването на ACR, получено при стандартни условия (средна порция от първа сутрешна урина) за определяне на микроалбуминурия, тъй като това изключва ортостатичния ефект върху протеиновия компонент.

**Таблица 15: Сравнителни данни за микроалбинурията и ACR (по 92).
Дефиниция на микроалбинурията**

Урина	Индивиди	Долна граница	Горна граница	Единици
24-h урина		30	300	mg/24h (<u>milligram</u> albumin per 24 hours)
4-6-h		20	200	µg/min (<u>microgram</u> albumin per minute)
Еднократна (сутрешна)		30	300	mg/l (milligram albumin per <u>litre</u> of urine) or µg/g (microgram albumin per gram of urine)
ACR в еднократна сутрешна урина	жени	3.5	25 или 35	mg/mmol (milligram albumin per <u>millimole</u> creatinine)
		30	400	µg/mg (microgram albumin per milligram creatinine)
	мъже	2.5 или 3.5 30	25 или 35 300	mg/mmol µg/mg

ОБ в 24-часова урина корелира добре с UPCR. Това съотношение, умножено по 0.63, дава общия размер на белтъците в урината. Ето и препоръките и съображенията на ADA, NKF и NKDEP/IFCC от 2013 г. (92):

а/ измерване на албинурията, а не на протеинурията, защото последната е по-неточна за анализ и показва интерференция;

б/ точното количествено определяне на албумина (за предпочитане имунологично) в урината и на съотношението аблумин/креатинин вместо протеинурията и микроалбинурията отразяват натрупаните доказателства относно неговата полза не само при диабетната нефропатия, но и при всички ХБЗ, защото е силен предиктор за прогресия;

в/ отчитане на албинурията в три категории: А1 - нормална до леко увеличена, < 30 mg/24h; А2 - умерено увеличена, 30-300mg/24h; А3 - силно увеличена, > 300mg/24h; отчитане на грам креатинин или за 24 часа.

В САЩ и Европа (92) около 8% от възрастните хора (на повече от 65 г.) имат микроалбуминурия, а 1% имат макроалбуминурия. Микроалбуминурия се открива при един от всеки трима души с диабет (I и II тип) и при един от всеки седем души с високо кръвно налягане. Диабетната нефропатия в момента е водеща причина за ТБН в западния свят. Това може да обясни защо тестовете за идентифициране на микроалбуминурия са станали стандарт за скрининг на пациенти с диабет тип I и тип II, хипертоници и ССЗ. Всеки пациент с диабет тип I и тип II, който е между 12- и 70-годишна възраст, трябва да провежда тест на урината за албуминурия най-малко веднъж годишно. Актуалните указания препоръчват скрининг за албуминурия при пациенти с рискови фактори за хронични бъбречни заболявания, включително диабет, високо кръвно налягане, системни заболявания, по-възрастни от 60 години и с фамилна анамнеза за бъбречна недостатъчност. Пациентите с положителен тест лента (1 + или по-висока) трябва да бъдат подложени за потвърждение на протеинурия от количествено измерване на АСР и РСР в рамките на 3 месеца (табл. 16, 17).

Таблица 16: Връзка между албуминурия и протеинурия (по 92)

Категории	Норма или леко увеличена (A1)	Умерено увеличена (A2)	Силно увеличена (A3)
AER (mg/24 hours)	<30	30–300	>300
PER (mg/24 hours)	<150	150–500	>500
ACR mg/mmol (mg/g)	<3 (<30)	3–30 (30–300)	>30 (>300)
PCR (mg/mmol) (mg/g)	<15 (<150)	15–50 (150–500)	>50 (>500)
Тест ленти ОБ	Отриц. или следи	Следи до +	1 + и повече

Таблица 17: Референтни стойности на екскрецията на албумин (нормално, високо нормално, микроалбуминурия, макроалбуминурия) (по 92)

			Spot urine			
	24-h urine albumin (mg/24h)	First morning void albumin (µg/min)	Albumin (mg/L)	Gender	Albumin/creatinine ratio	
					mg/mmol	mg/g
Normal	<15	<10	<10	M	<1.25	<10
				F	<1.75	<15
High normal	15 to <30	10 to <20	10 to <20	M	1.25 to <2.5	10 to <20
				F	1.75 to <3.5	15 to <30
Microalbuminuria	30 to <300	20 to <200	20 to <200	M	2.5 to <25	20 to <200
				F	3.5 to <35	30 to <300
Macroalbuminuria	>300	>200	>200	M	>25	>200
				F	>35	>300

През януари 2013 г. KDIGO, NKDEP, NKF и IFCC (92, 145, 164, 165) препоръчват нови „златни“ правила за диагноза на ХБЗ за унифициране в целия свят. Изтъквайки голямата роля на приетите и използваните досега правила, авторите съобщават, че 10-годишните проучвания показват недооценяване на някои аспекти и на необходимостта от приемане на нови правила (1). Ето някои от тях:

1. Микроалбуминурията, използвана главно при диагнозата на диабетната нефропатия, се заменя с названието албуминурия (A2).

2. Албуминът в урината, като силен предиктор на прогресия трябва да се изследва количествено, за предпочитане имунологично, при диабетна нефропатия и всички други хронични бъбречни заболявания.

3. Албуминурията да се отчита в три категории:

а/ A1 - нормална до леко увеличена албуминурия, < 30 mg/L;

б/ A2 - (известна като микроалбуминурия) - умерено увеличена албуминурия, 30-300mg/L;

в/ A3 - (известна като макроалбуминурия) - силно увеличена албуминурия, > 300mg/L.

4. Съотношението ACR и PCR за оценка на албуминурията да се провежда в сутрешна или случайна порция урина.

Представените в литературата данни категорично подкрепят становището, че за по-добра и ранна диагностика на бъбречните заболявания, особено на хроничното бъбречно заболяване при диабет тип 2, есенциална хипертония и първични бъбречни заболявания са нужни надежни биомаркери. Един от биомаркерите - креатининът, който е метаболитен продукт, е рутинно, широко използван показател за бъбречни заболявания. Въпреки многото си плюсове, креатининът има редица недостатъци. След многогодишно търсене и проверка на най-различни показатели (метаболити и белтъци) през последното десетилетие се предлага нов, алтернативен на креатинина биомаркер - цистатин С. Той е нов, обещаващ биомаркер за оценка на гломерулна филтрация. Самостоятелното използване на цистатин С или използването му едновременно с креатинина е обещаващ, но не решен проблем. За диагностика и лечение на ХБЗ, освен оценка на ГФ, се изискват биомаркери за установяване увреждането на бъбреците. За тази цел основно значение има албуминурията и ACR, както и протеинурията и PCR съгласно препоръките на NKF. Албуминурията не корелира силно с ГФ. Затова ранната диагностика на ХБЗ особено при диабет тип 2 и есенциална хипертония изисква едновременното изследване на протеиновите показатели и ГФ, които в около 20- 30% се разминават. Остава открит въпросът – не е ли време микроалбуминурията да бъде заменена с нов начин за класифициране на албуминурията в категориите A1, A2 и A3 съгласно препоръките на KDIGO от януари 2013 г. (табл. 18).

Таблица 18: Ръководство за честотата на изследване на болни с ХБЗ. Посочена е класификацията на ХБЗ, съгласно ГФ и албуминурията (по класификация A1, A2 и A3), според препоръките на NKF от 2013 (92), и информация колко пъти годишно трябва да се изследват ГФ и албуминурията. Риск за ХБЗ: зелено – в норма; жълто - малък; бежово - умерен; оранжев – висок; червен – много висок (по Rollins 2013)

Guide to CKD Testing Frequency

This heat map grid highlights in numbers and increasing color intensity (from green to deep red) how many times per year CKD patients should be tested for GFR and albuminuria.

			Persistent albuminuria categories		
			Description and range		
			A1	A2	A3
			Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
GFR categories in mL/min/1.73m ²			<30 mg/G	30–300 mg/G	>300 mg/G
Description and range					
G1	Normal or high	≥90	1 if CKD	1	2
G2	Mildly decreased	60–89	1 if CKD	1	2
G3a	Mildly to moderately decreased	45–59	1	2	3
G3b	Moderately to severely decreased	30–44	2	3	3
G4	Severely decreased	15–29	3	3	4+
G5	Kidney failure	<15	4+	4+	4+

Reprinted with permission from Kidney International Supplements.

3 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

3.1 Цел

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

За постигане на поставената цел си поставихме следните задачи.

3.2 Задачи

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

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

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

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

5. Статистическа обработка на получените резултати чрез вариационен, дескриптивен, корелационен, персентилен и графичен (включително ROC криви) анализ.

6. Определяне на референтни стойностите на общо 20 показатели в кръвен серум и урина при 153 клинично здрави лица в това число и на

цистатин С в кръвния серум и на албумина в урината, АСR, общ белтък и РСR.

7. Определяне на диагностичната надежност на албуминурия А1, А2 и А3, на АСR и РСR за ХБЗ следствие на диабет тип 2, есенциална хипертония и първични бъбречни заболявания

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

4 МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За събиране на научната информация за използвани:

4.1 Анкетен метод

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

4.2 Клиничен метод

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

4.3 Лабораторни изследвания

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

4.3.1 Определяне на цистатин С

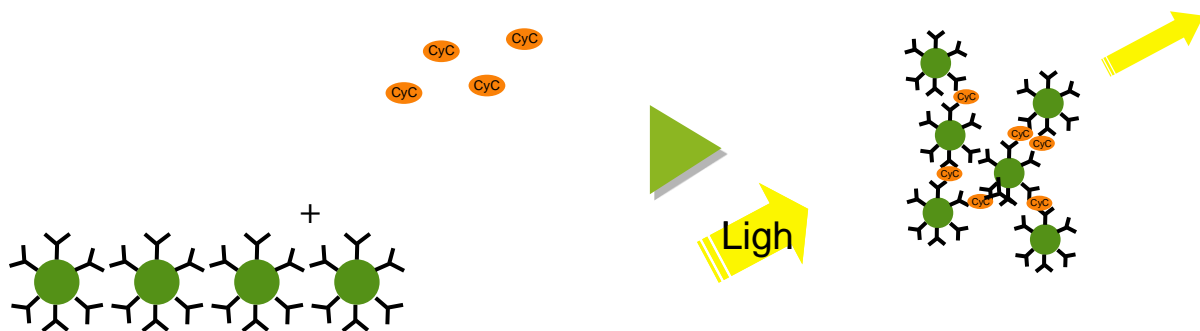
При избора на метод за определяне на даден показател са спазвани следните правила:

- Избор на утвърден в литературата метод, който гарантира точност, прецизност и възпроизводимост;
- Възможност за използване на метода у нас;
- Наличност на оборудване;
- Цена на реактивите и консумативите;
- Чувствителност и специфичност на метода;
- Интерференция от хемолиза, хиперлипидемия и хипербилирубинемия.

Използваните от нас методи отговарят на тези изисквания.

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

а/ Принцип на метода - натоварени с античовешки цистатин С антитела латексови частички в буфера реагират с цистатин С в пробата, при което се формират антиген-антитяло комплекси, които се отчитат (фиг. 14).



Фигура 14: Принцип на реакцията

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

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

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

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

г/ За стандартизация се използва MULTIGENT Cystatin C Calibrator, който е човешки серум с рекомбинантен цистатин С, стабилизирани с

0.09% натриев азид. Този стандарт е съпоставим и проследим спрямо European Reference Material ERM-DA471/IFCC. Калибрационната крива е 6-точкова. Стабилността на калибратора след отваряне е 60 дена;

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

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

4.3.2 Определяне на албумина в урината

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

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

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

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

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

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

4.3.3 Определяне на общия белтък в урината

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

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

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

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

г/ Контроли – Lyphochek Quantitative Urine Control;

д/ Материал – използвана е еднократна порция урина;

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

4.3.4 Определяне на останалите лабораторни показатели

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

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

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

Анализът на всеки един от тези лабораторни показатели се осъществява автоматично чрез системата Architect с8000 и оригинални реактиви на фирмата Abbott Laboratories Diagnostics. За калибриране се използват съответни стандарти, а за контролиране - съответните контроли

на две нива нива. HbA1c – йонообменна хроматография с анализатор DS5, Drew Scientific.

4.3.5 Определяне на гломерулната филтрация

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

а/ MDRD само с креатинин

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

б/ СКД-ЕПІ само с креатинин

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

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

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

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

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

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

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

г/ СКД-ЕПІ с креатинин и цистатин С

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

- eGFR (mL/min/1.73 m²) = 130 x (sCr/0.7)^{-0.248} x (sCys/0.8)^{-0.711} x 0.995^{age} (за жени с креатинин > 0.7 и цистатин C > 0.8)

- eGFR (mL/min/1.73 m²) = 135 x (sCr/0.9)^{-0.207} x (sCys/0.8)^{-0.375} x 0.995^{age} (за мъже с креатинин ≤ 0.9 и цистатин C ≤ 0.8)

- eGFR (mL/min/1.73 m²) = 135 x (sCr/0.9)^{-0.207} x (sCys/0.8)^{-0.711} x 0.995^{age} (за мъже с креатинин > 0.9 и цистатин C > 0.8)

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

4.4 Статистически методи

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

Бяха приложени следните методи:

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

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

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

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

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

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

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

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

9. Критерии за валидизация на скрининг тестове

За оценяване **валидността** на скринирация (диагностициращия) тест се използват следните критерии¹:

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

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

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

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

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

¹ Е. Шипковенска, Л. Георгиева, Г. Генчев Профилактика на заболяванията, в "Приложна епидемиология и медицина базирана на доказателства". София, Делфи 2002, 121-138.

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

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

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

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

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

Прецизност (Accuracy) – относителен дял на верните отговори:

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

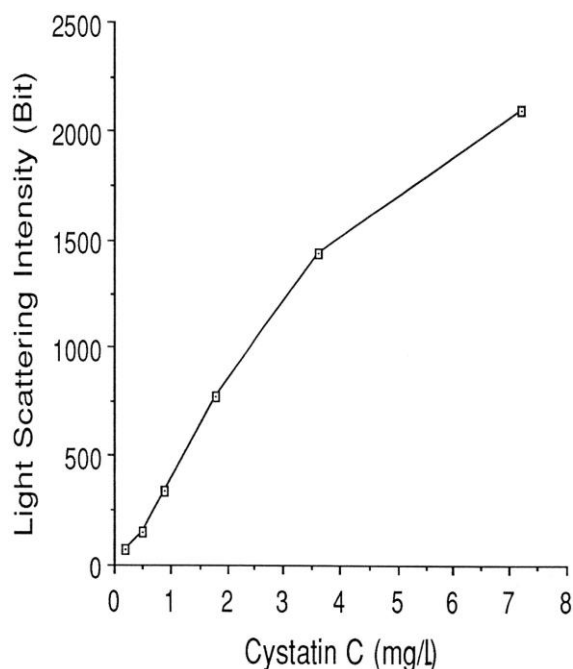
5 РЕЗУЛТАТИ

5.1 Резултати от използваните методи

Валидирането на методите за цистатин и албумин се осъществява съгласно препоръките на SCACB. Тези препоръки предоставят указания за минималните изисквания за валидиране на аналитично изпълнение при въвеждане на нови методи в клинична лаборатория. С валидирането се цели „да бъдат предоставени обективни доказателства, че дадена величина покрива специфицирани изисквания.“ – IVM, 2008, Geneva.

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

а/ Калибрационна крива. Резултатите за цистатин С се отчитат по б-точкова калибрационна крива с концентрации на 0,4 mg/l; 1.2 mg/l; 2.4 mg/l; 4,8 mg/l; 8,0 mg/l. Разреждането се осъществява с 0.9% натриев хлорид. Всяка точка е определена трикратно (фиг. 15).



Фигура 15: Шест точкова калибрационна крива за цистатин С

б/ Линеиност. За определяне на линеиността използваме проба с концентрация на систатин С 4.8 mg/l, която разреждаме с 0.9% натриев хлорид за да се получи 75%, 50%, 25%, 10% от стойността на неразредената проба. Така получените резултати са сравнени с Т-тест. Методът остава линеен в границите от 0.4 до 8.0 mg/l.

в/ Невъзпроизводимост.

В рамките на един ден са анализирани по 20 контроли от три концентрационни нива (0.60, 0.88 и 1.13 mg/l), които са оценени по съответните калибрационни криви. Резултатите са представени в таблица 19.

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

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

Таблица 19: Точност и възпроизводимост в непрекъсната серия за параметъра Cystatin C

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

Точност и възпроизводимост във времето

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

Таблица 20: Точност и възпроизводимост във времето за параметъра Cystatin C

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

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

Представените данни показват, че точността и възпроизводимостта във времето на метода са в границите на приемливост на резултатите.

Достоверността на метода, изразена като отклонение на средната стойност на контролите от номиналната им стойност, също е в приемливите граници.

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

Валидиране на имунотурбидиметричния метод за албумин в урината

а/ Калбрационна крива. Резултатите за албумин в урината се отчитат по 6-точкова калибрационна крива с концентрации на 5 mg/l; 25 mg/l; 100 mg/l; 300 mg/l; 500 mg/l. Използват се готови калибратори (фиг. 16).



Фигура 16: Калибрационна крива за албумин в урината

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

в/ Невъзпроизводимост.

Точност и възпроизводимост в непрекъсната серия

В рамките на един ден са анализирани по 22 контроли от две концентрационни нива (30.0 и 90.0 mg/l), които са оценени по съответните калибрационни криви. Резултатите са представени в таблица 21.

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

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

Таблица 21: Точност и възпроизводимост в непрекъсната серия за параметъра uAlb

	Control 1		Control 2	
	30.0 mg/l	Ac, %	90.0 mg/l	Ac, %
	30	0.00	92	2.22
	31	3.33	91	1.11
	29	-3.33	92	2.22
	29	-3.33	92	2.22
	28	-6.67	92	2.22
	32	6.67	89	-1.11
	34	13.33	88	-2.22
	31	3.33	91	1.11
	29	-3.33	88	-2.22
	31	3.33	90	0.00
	33	10.00	91	1.11
	30	0.00	93	3.33
	29	-3.33	91	1.11
	30	0.00	88	-2.22
	29	-3.33	92	2.22
	28	-6.67	93	3.33
	30	0.00	91	1.11
	30	0.00	86	-4.44
	28	-6.67	89	-1.11
	31	3.33	90	0.00
	33	10.00	93	3.33
	32	6.67	91	1.11
Средно	30.32	1.06 (достоверност)	90.59	0.66 (достоверност)
SD	1.701		1.894	
CV, %	5.61		2.09	

Точност и възпроизводимост във времето

В рамките на 22 дни са анализирани по една контрола от две концентрационни нива (30.0 и 90.0 mg/l), които са оценени по

съответните калибрационни криви. Получените резултати са представени в таблица 22.

Таблица 22: Точност и възпроизводимост във времето за параметъра uAlb

Ден No.	Control 1		Control 2	
	30.0 mg/l	Ac, %	90.0 mg/l	Ac, %
1	35	16.67	95	5.56
2	31	3.33	91	1.11
3	29	-3.33	100	11.11
4	29	-3.33	92	2.22
5	28	-6.67	89	-1.11
6	32	6.67	100	11.11
7	35	16.67	87	-3.33
8	32	6.67	89	-1.11
9	28	-6.67	93	3.33
10	32	6.67	89	-1.11
11	35	16.67	90	0.00
12	30	0.00	100	11.11
13	37	23.33	92	2.22
14	35	16.67	85	-5.56
15	25	-16.67	102	13.33
16	37	23.33	95	5.56
17	37	23.33	94	4.44
18	31	3.33	85	-5.56
19	27	-10.00	86	-4.44
20	25	-16.67	90	0.00
21	24	-20.00	89	-1.11
22	32	6.67	91	1.11
Mean	31.18	3.94 (достоверност)	92.00	2.22 (достоверност)
SD	4.019		4.976	
CV, %	12.89		5.41	

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

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

5.2 Резултати на изследваните пациенти

5.2.1 Контроли (клинично здрави лица)

Данните от изследваните 153 контроли по отношение на възраст и антропометрични характеристики са представени в таблица 23.

Средната възраст на контролите е 44,53 в интервал от 20 до 77 години, средно тегло 65,74 кг., ръст 165,81 см. и ВМІ 23,91. Изследваните показатели са представени в таблица 24 и корелационните коефициенти на таблица 25. Концентрацията на цистатин С е в границите от 0,50 до 1,02, $\bar{X} = 0,74$ mg/l, а тази на албумина в урината от 5 до 22 mg/l, средно 12,92 mg/l. Тази концентрация на албумина се включва в рамките на албинурия А1. Процентът на албумина от общия белтък е 26,14 с максимум до 68,18. Както се очаква, албуминът е само част от общия белтък, а останалите са други нискомолекулни белтъци, тубулни белтъци и тъканни белтъци (Tamm-Horsfall proteins). Протеинурията средно е 54,39 mg/l, като максималната стойност достига 109 mg/l. Средните стойности на АCR и PCR са съответно 2,47 и 10,50.

Таблица 23 : Вариационен анализ на изследвания контингент по възраст и антропометрични характеристики

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

Таблица 24: Вариационен анализ на изследваните показатели в контролната група

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

Таблица 25: Корелационни коефициенти между гломерулната филтрация и показателите креатинин, цистатин С, албумин в урината и ACR

Показатели	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (СКД-EPI) само с креатинин	eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С	eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С
Креатинин	-0,679***	-0,686***	0,139	-0,360***
Цистатин С	-0,108	-0,148	-0,891***	-0,688***
Албумин в урината	0,065	0,077	-0,122	-0,002
ACR	0,101	0,082	-0,111	0,013

*** - $p < 0,001$

Гломерулната филтрация е близка при определяне с различните осъвременени формули (табл. 24), но най-приемлива е тази, определена с комбинацията цистатин С и креатинин ($97,52 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) и съобразена с възрастта и пола. Най-висока е ГФ, изчислена само с цистатин С - $109,81 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ и най-ниска - само с креатинин по формулата MDRD - $76,24 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Серумният цистатин С и креатинин корелират обратнопропорционално с ГФ в различна степен с показател за значимост $p < 0,05$. Референтните стойности съгласно персантилния анализ (0,025 и 0,975) на основните показатели (цистатин С, албумин и ACR) са демонстрирани на таблица 26.

Таблица 26: Референтни стойности на показателите цистатин С, албумин в урината и АСР

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

ДИ – доверителен интервал.

Установяваме значима полова разлика за албумина в урината с високи стойности при жените. ГФ е статистически по-висока при мъжете само при формулата с цистатин С (табл. 27).

Албуминът в урината корелира значимо, правопрпорционално с АСР ($r=0,224$, $p<0,05$) и обратнопропорционално с креатинин в серума ($r=-0,178$, $p<0,05$) (табл. 28).

Таблица 27: Сравнителен анализ на албумина и ГФ при двата пола

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

Таблица 28: Корелационни коефициенти между албумина и показателите креатинин в серум, цистатин, ACR, PCR, възраст и BMI

Показател	Албумин
Креатинин в серум	-0,178*
Цистатин С	0,012
ACR	0,224*
PCR	-0,099
Възраст (години)	0,112
BMI (kg/m ²)	0,070

* - $p < 0,05$

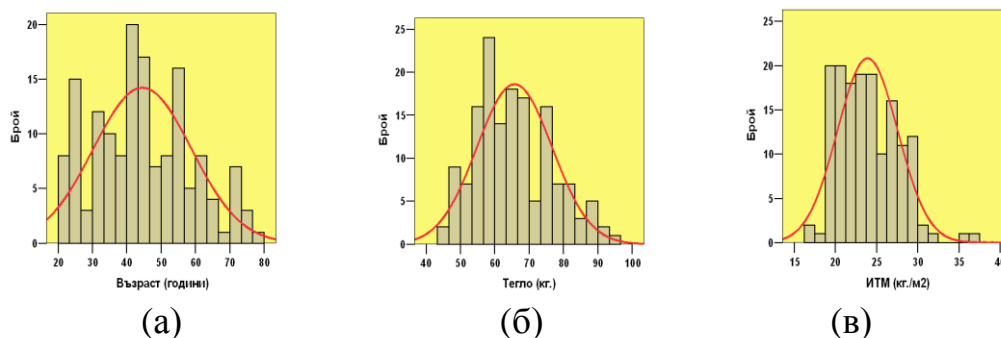
Таблица 29: Корелационни коефициенти между ГФ и показателите албумин, общ белтък, ACR, PCR, възраст и BMI

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

*** - $p < 0,001$

Представените в табл. 29 резултати показват корелационните зависимости между ГФ, определена с различните формули и основните показатели. Особено ясно изразена е тази корелация с цистатин С, креатинина и възрастта. Всички контроли са с албуминурия A1 с изключение на двама и ГФ между 75 и 112 mL/min/1.73 m², в зависимост от използваното уравнение.

Показателите възраст, BMI (ИТМ) и тегло (фиг. 17) имат Гаусово разпределение (Колмогоров-Смирнов, $p = 0,499$; $p = 0,291$ и $p = 0,394$).



Фигура 17: Честотно разпределение на контролите по възраст (а), тегло (б) и ВМІ (в). При всички показатели е Гаусово (тест на Колмогоров-Смирнов, $p \geq 0,05$)

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

5.2.2 Диабетици

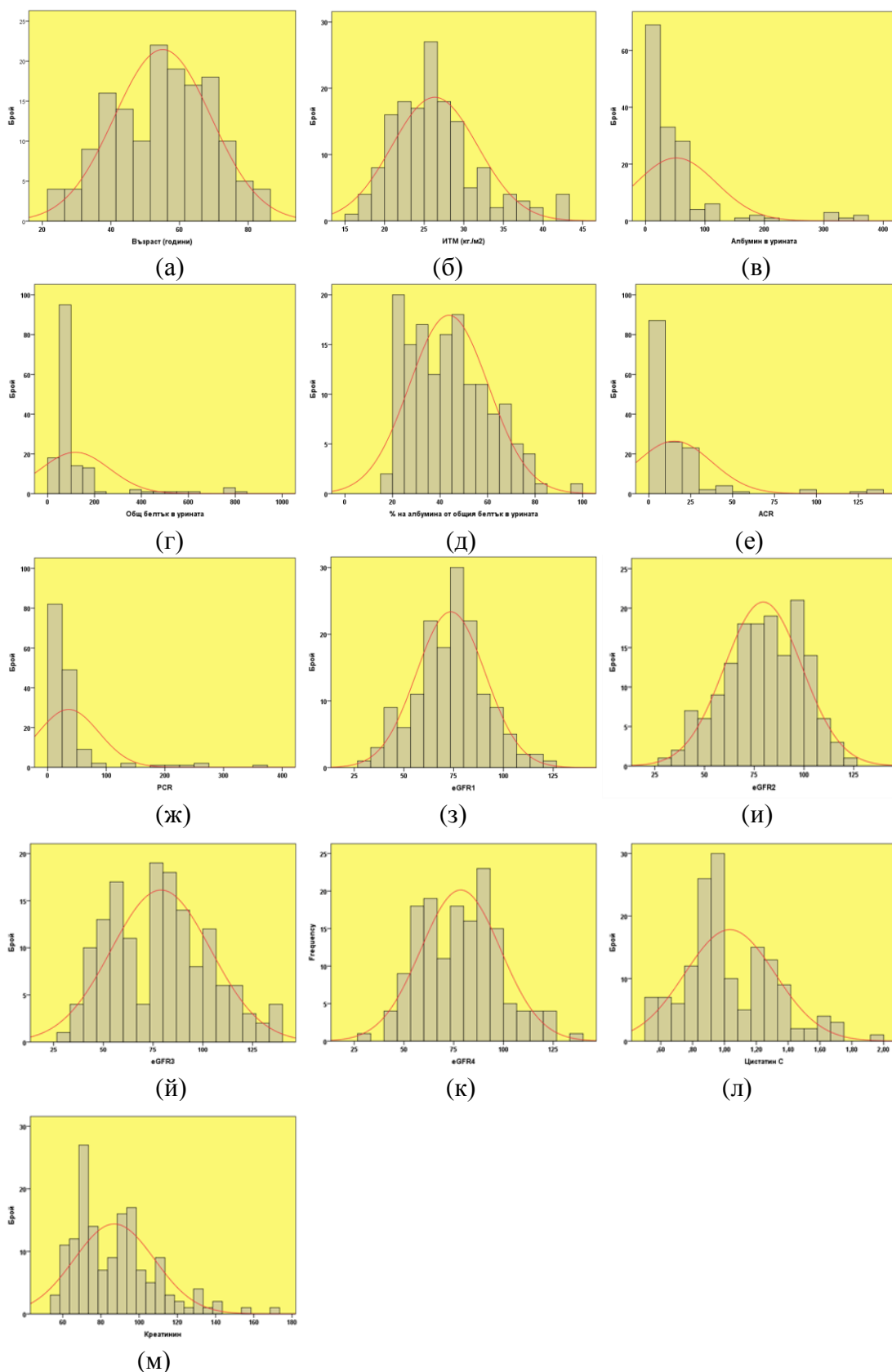
В групата на диабетичите са включени общо 152 болни с диабет тип 2, от които 80 (52,6%) – мъже и 72 (47,4%) - жени. Средната възраст е 55,12 г. в интервал от 24 до 82 г. и е по-висока от тази на контролите (табл. 30). При подбора на всички тези диабетичи не е регистрирано повишено кръвно налягане въпреки продължителността на диабета и въпреки многократната проверка на кръвното налягане.

Таблица 30: Вариационен анализ на изследваните показатели при диабетичите

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

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

Не-Гаусово разпределение показват повечето от показателите. Това е свързано с различната степен на изразеност на показателя от референтната до патологичната област. От графиките е видно, че при диабетите разпределението на албумин и ОБ в урината, АСR и РСR е изтеглено вляво, към референтните интервали с преобладаване на албуминурия А1 и А2 и нормална до умерена протеинурия. Честотното разпределение по ГФ е Гаусов тип с уравненията само с креатинин и не е нормално с комбинираната формула и тази само с цистатин С. С последните две уравнения кривата е разширена доста повече. Разпределението на креатинина в серума е по-широко и леко изтеглено към референтната област в сравнение с цистатин С. Това е резултат на съчетаването на болни с нормален креатинин и увеличен цистатин С.



Фигура 18: Честотно разпределение на диабетичите по възраст, $p=0,681$ (а); по BMI, $p=0,091$ (б); по албумин в урината, $p<0,001$ (в); по общ белтък в урината, $p<0,001$ (г); по процент на албумина от общия белтък, $p=0,36$ (д); по ACR $p<0,001$ (е); по PCR, $p<0,001$ (ж); по ГФ с MDRD, $p=0,200$ (з); по ГФ СКД-ЕПІ с креатинин, $p=0,200$ (и); по ГФ СКД-ЕПІ само с цистатин С, $p<0,001$ (й); ГФ СКД-ЕПІ с креатинин и цистатин С, $p=0,200$ (к); по серумен цистатин С, $p<0,001$ (л); по серумен креатинин, $p<0,001$ (м).

Данните от вариационния анализ на изследваните показатели са дадени в табл. 31. Статистически значими промени показват всички изследвани показатели ($p < 0,05$). Средната стойност на екскрецията на албумина е увеличена над четири пъти спрямо контролите (51,43 спрямо 12,92 mg/l), а ОБ над два пъти (118 спрямо 54,39 mg/l). Всички показатели от липидния профил са променени, както и пикочната киселина е увеличена (316,74 спрямо 256,92 $\mu\text{mol/l}$). Въпреки контролираната терапия глюкозата и HbA1c са също увеличени.

Таблица 31: Вариационен анализ на изследваните показатели при диабетците

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

Средната стойност на ГФ, определена и с четирите формули, е намалена спрямо контролите с най-голям процент при уравнението само с цистатин С (38%), следвана от комбинираната формула с креатинин и цистатин С (24%). Най-малка е разликата при формулата само с креатинин с MDRD (3,7%) (табл. 31). Много повече са диабетиците с албинурия А2 и А3 (48,6%) в сравнение с тези с ГФ <60 mL/min/1.73 m² (29,6%).

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

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

От таблица 32 се вижда, че и при диабетиците се регистрира незначителна полова разлика при някои показатели. Обратно на контролите албинурията и протеинурията са по-силно изразени при мъжете в сравнение с жените (56,06 към 46,42 mg/l и 127,23 към 107,78 mg/l съответно).

Таблица 33: Сравнителен анализ на контроли и диабетици по избрани показатели

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

В таблица 33 се сравняват основните показатели между контроли и диабетици. Контроли и диабетици се разграничават значително по почти всички показатели, когато се сравняват средните аритметични стойности. От проследените 152 диабетици с албуминурия А1 са 77 болни - 51,3%, с албуминурия А2 - 67 болни - 44,6% и с албуминурия А3 - само 6 болни - 4% (табл. 37).

Протеинурията е правопрпорционално и статистически значимо свързана с показателите давност на заболяването, АСР, креатинин в серум и Цистатин С (таблица 34).

С протеинурия до 150 mg/l са 126 болни - 84%, до 0,5g/l са 20 болни - 13,3%,и само 4 болни имат ОБ над 0,5 g/l - 2,7%.

Степента на албуминурията корелира слабо и правопрпорционално с възрастта на болните, давността на заболяването, общия белтък в урината, РСР, цистатин С и креатинин в серума и изразено с концентрацията на HbA1c (таблица 35). При общия белтък корелацията е по-силна в сравнение с албумина и АСР.

Таблица 34: Корелационни коефициенти между общия белтък и основните показатели.

Показател	Общ белтък в урината
Възраст (години)	0,107
Давност на заболяването	0,635***
АСР	0,715***
Цистатин С	0,457***
Креатинин в серум	0,200*

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

Таблица 35: Корелационни коефициенти между албумина в урината и основните показатели

Показател	Албумин в урината
Възраст (години)	0,204*
Давност на заболяването	0,219**
Общ белтък в урината	0,258**
ACR	0,258**
PCR	0,170*
Цистатин С	0,243**
Креатинин в серум	0,182*
Гликиран хемоглобин	0,581***
Глюкоза	0,204*

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

От таблици 35 и 34 се вижда, че албуминът в урината корелира най-добре с HbA1c ($r=0,581$), ACR ($r=0,258$) и общия белтък ($r=0,258$) в урината. Корелацията на албумина е по-силна с цистатин С ($r=0,243$) в сравнение с креатинина ($r=0,182$). При общия белтък в урината корелацията е силна с ACR ($r=0,715$) и давността на заболяването ($r=0,635$). И тук корелацията е по-силна с цистатин С ($r=0,457$), отколкото с креатинина ($r=0,200$).

На таблица 36 са представени показателите чувствителност и специфичност, както и предиктивната стойност на изследваните параметри. Избраната прагова величина цели постигането на висока чувствителност и прецизност. Най-висока чувствителност показва ACR (94%), а най-голяма специфичност - албуминът и ГФ (с известна разлика за отделните формули). Положителната предиктивна стойност е най-висока за eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С - 76%, а отрицателната предиктивна стойност за ACR е 91%. С най-висока прецизност са eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С със 78% и ACR със 77%.

Таблица 36: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на диабетиците от здравите индивиди

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

Таблица 37: Сравнителен анализ на възрастта, давността на заболяването и концентрацията на HbA1c според нивата на албумина в урината

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

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

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

На таблица 37 е показана зависимостта на албуминурията от възрастта на болните, от давността на заболяването и процента на HbA1c. Колкото по млади са болните и с колкото по-кратка давност е диабетът им, толкова по-често са с албуминурия А1.

Таблица 38: Корелационни коефициенти между гломерулната филтрация и някои показатели

Показатели	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (СКД-EPI) само с креатинин	eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С	eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С
Албумин в урината	-0,079	-0,120*	-0,562***	-0,471***
Общ белтък в урината	-0,070	-0,092	-0,395***	-0,337***
ACR	-0,070	-0,119*	-0,530***	-0,443***
PCR	-0,072	-0,110	-0,430***	-0,362***
Възраст	-0,311***	-0,486***	-0,601***	-0,613***
ВМІ	-0,077	-0,147*	-0,130*	-0,136*
Давност на заболяването	-0,458***	-0,481***	-0,719***	-0,716***
HbA1c	-0,072	-0,118*	-0,527***	-0,449***
Глюкоза	-0,101	-0,151**	-0,505***	-0,441***
Общ холестерол	-0,055	-0,092	-0,431***	-0,370***
LDL-С	-0,091	-0,125*	-0,428***	-0,382***
Триглицериди	-0,033	-0,074	-0,379***	-0,305***
Цистатин С	-0,207***	-0,272***	-0,956***	-0,833***
Креатинин в кръвен серум	-0,754***	-0,755***	-0,092	-0,396***

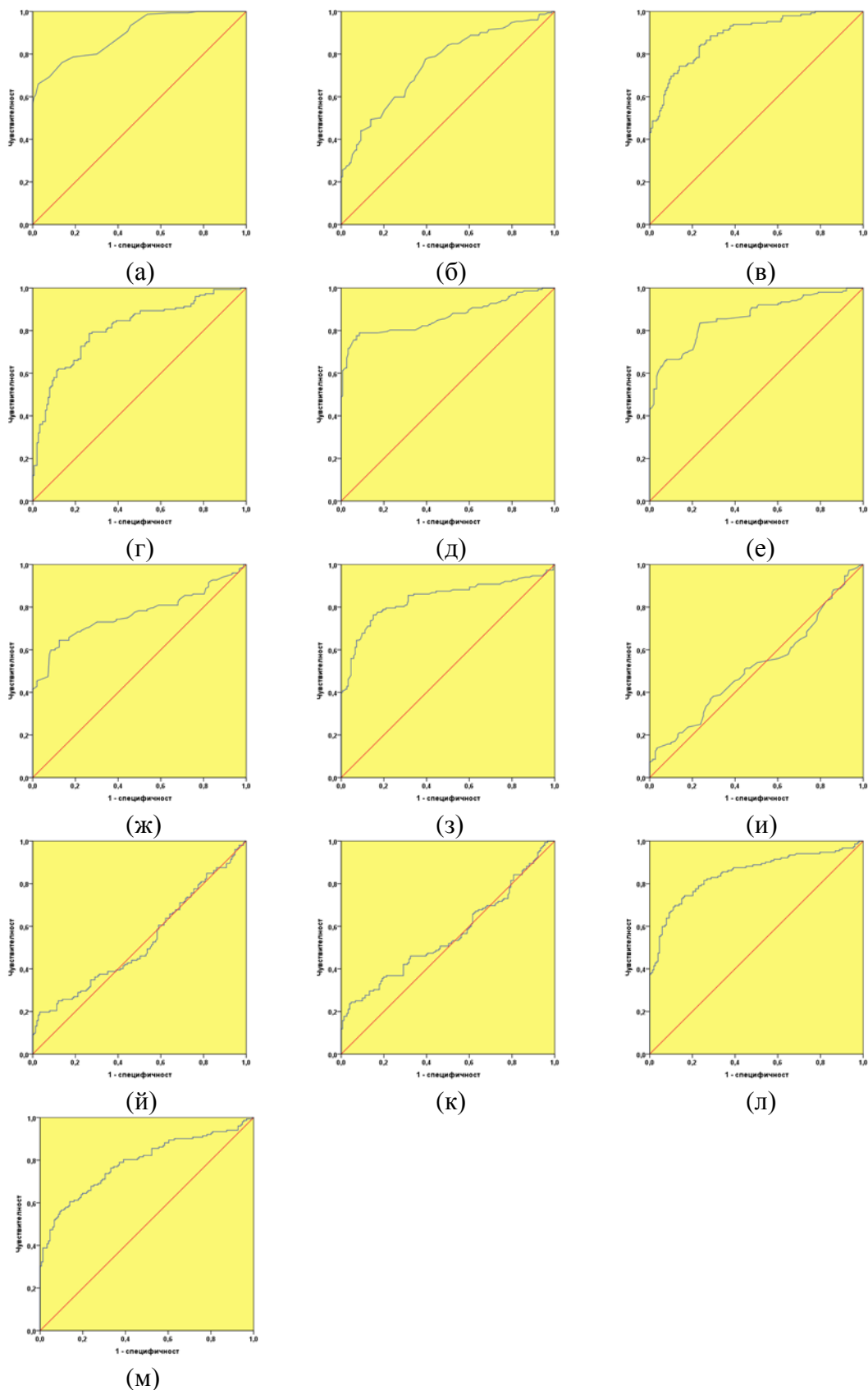
*** - $p < 0,001$ ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Средните нива на ГФ, определени с 4-те формули, са по-ниски от тези в контролната група (таблица 33). С ГФ, изчислена с комбинираната формула, $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ са 48 болни - 31,6%; с ГФ от 89 до 60 mL/min/1.73 m^2 са 72 болни - 47,4%; с от 59 до 45 са 28 болни -18,4% и с от 30 до 44 са 4 болни - 2,6%. С ГФ под 60 mL/min/1.73 m^2 са 32 болни -

21,1%. Корелационните коефициенти на ГФ, изчислена с четирите формули, е обратнопропорционална на всички изследвани показатели. Коефициентите са най-високи на ГФ с давност на заболяването ($r=-0,716$), с възрастта ($r= -0,613$), с албумина в урината ($r= -0,471$) и с HbA1c ($r= -0,449$). Прави впечатление, че ГФ, изчислена само с цистатин С, дава по-високи корелационни коефициенти в сравнение с останалите формули. Най-ниска е корелацията с уравнението MDRD.

Липидният профил е променен при голяма част от болните – общ холестерол при cut off > 6 mmol/l при 62 болни - 40,8%; LDL-C при cut off $>3,65$ mmol/l при 71 болни - 46,7% и HDL-C при cut off $<1,0$ mmol/l при 61 болни - 40,6%. Въпреки провежданата терапия глюкозата и гликираният хемоглобин по време на изследването са също значително повишени спрямо контролите (средна стойност - 7,28 - към 4,93 и 7,17 - към 5,37 съответно). При приет cut off за HbA1c $<6,5\%$ и за глюкоза $> 6,3$ mmol/l с увеличени стойности са 59,7% и 60% съответно от диабетците.

За определяне праговите стойности на количествените променливи е приложен анализ на ROC криви (фигура 19) с критерии чувствителност и прецизност в проценти. При този анализ се установява, че най-добър показател за отграничаване на диабетците от контролите е ACR с чувствителност 94% и прецизност 77%, следван от ГФ, оценена с комбинация от цистатин С и креатинин при чувствителност 82% и прецизност 78%.



Фигура 19: ROC-криви за определяне на прагови стойности при отграничаването на диабетците от контролната група: а/ албумин в урината (площ под кривата 0,895, $p < 0,001$); б/ ОБ в урината (площ под кривата 0,751, $p < 0,001$); в/ ACR (площ под кривата 0,888, $p < 0,001$); г/ PCR (площ под кривата 0,811, $p < 0,001$); е/ LDL-C (площ под кривата 0,866, $p < 0,001$); ж/ TG (площ под кривата 0,767, $p < 0,001$); з/ серумен цистатин С (площ под кривата 0,839, $p < 0,001$); и/ серумен креатинин (площ под кривата 0,521, $p = 0,535$); й/ eGFR с MDRD (площ под кривата 0,526, $p = 0,426$); к/ eGFR с CKD-EPI с креатинин (площ под кривата 0,560, $p = 0,070$); л/ eGFR с CKD-EPI с цистатин С (площ под кривата 0,846, $p < 0,001$); м/ eGFR с комбинираната формула (площ под кривата 0,787, $p < 0,001$).

Чрез анализа на ROC-кривите и оценката на площта под кривите много ясно се демонстрира диагностичната акуратност на отделните показатели, особено на албумина в урината и ACR. При сравнение на ROC-кривите на цистатин С и креатинин, се вижда предимството на първия (площ под кривата 0,839 спрямо 0,521). По отношение на ГФ, ROC кривите разкриват предимството на комбинираната формула или на формулата само с цистатин С спрямо формулите с креатинин (сравнете площта под кривата на фигура 19). При сравнение на албуминурията с ГФ прави впечатление, че по-голям е процентът на диабетиците с увеличена екскреция на албумин, албуминурия А2 - 44,77% и с А3 - 4%, или общо 48,67% спрямо 21,1% болни с ГФ<60 mL/min/1.73 m².

5.2.3 Хипертоници

В групата на хипертониците са включени общо 150 болни с първична (есенциална) хипертония, от които 65 (43,3%) мъже и 85 (56,7%) жени. Жените са малко повече от мъжете. Средната възраст е 49,85 г. в интервал от 21 г. до 74 г. и е в обхват, близък до този на контролите (таблица 39).

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

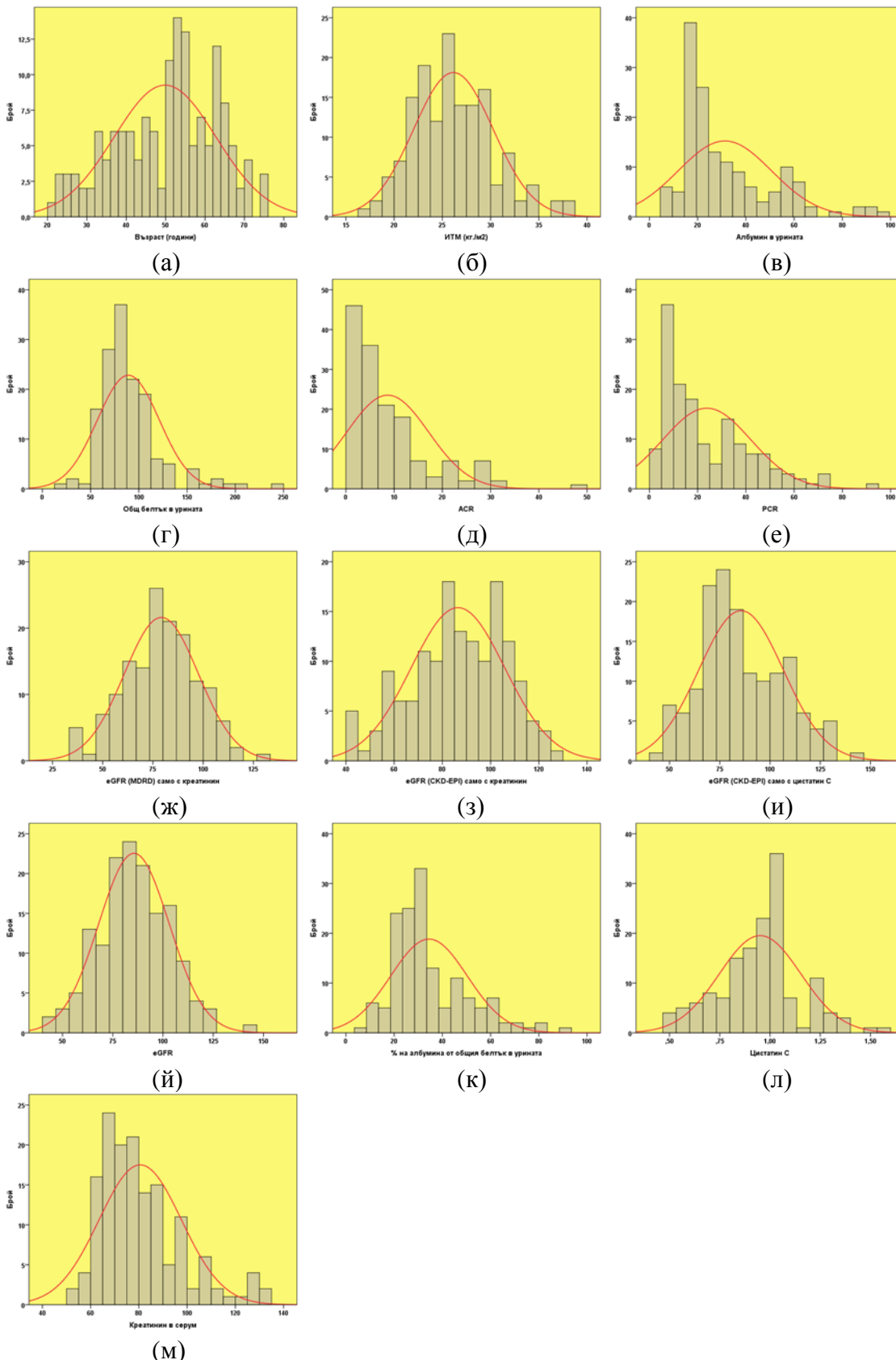
Таблица 39: Вариационен анализ на възрастта и антропометричните показатели при хипертониците

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

Хипертониците са с по-високи показатели за възраст (49,85 спрямо 44,53), тегло (73,95 спрямо 65,74 кг) и ВМІ (26,14 спрямо 23,91). Болните са с давност на хипертонията от 1 г. (2 болни) до 22 г. (1 болен) с интервал от 1 година, като най-много са болните с давност на хипертонията 3 г. (24 болни, 16%). С диастолично налягане > 81 mmHg по време на изследването са 87 болни (58%); със систолично налягане >140 mmHg са 50 болни (33%). Честотното разпределение при хипертониците на някои от показателите е представено на фигура 20.

От представените данни на фигура 20 се вижда, че Гаусово разпределение показват ВМІ и ГФ. Всички останали показатели имат не Гаусово разпределение. По отношение на възрастта разпределението е изместено в дясно към по-голямата възраст, а за всички останали показатели кривата е разширена и максимумът на разпределението е изместен в ляво по-близо до референтната област. Стойностите за цистатин С са разположени предимно в средата, докато за креатинина те са леко изместени в ляво, към горната референтна граница.

Данните от вариационният, сравнителният и корелационният анализ на изследваните показатели са представени последователно на таблици 40-42.



Фигура 20: Честотно разпределение при хипертоници по: а/ възраст, $p=0,001$; б/ BMI $p=0,200$; в/ албумин в урината, $p<0,001$; г/ общ белтък в урината, $p<0,001$; д/ ACR, $p<0,001$; е/ PCR, $p<0,001$; ж/ eGFR (MDRD) само с креатинин, $p=0,200$; з/ eGFR (CKD-EPI) само с креатинин, $p=0,078$; и/ eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С, $p=0,001$; й/ eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С, $p=0,200$; к/ процент на албумина от общия белтък в урината, $p<0,001$; л/ цистатин С, $p<0,001$; м/ креатинин в серум, $p<0,001$.

Таблица 40: Вариационен анализ на изследваните показатели при хипертониците

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

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

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

Таблица 41: Сравнителен анализ на албумин и общ белтък в урината при двата пола

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

При хипертониците за разлика от контролите, албуминът и общият белтък в урината са статистически незначимо по-високи при мъжете в сравнение с жените (табл. 41).

Таблица 42: Корелационни коефициенти между албумина в урината и някои показатели

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

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

Концентрацията на албумина в урината изразено, правопрпорционално корелира с общия белтък (r=0,675), ACR (r=0,640) и давност на заболяването (r=0,488). При сравнение на цистатин С с креатинина, корелацията е по-силна с цистатин С (r=0,388 спрямо r=0,366) (табл. 42).

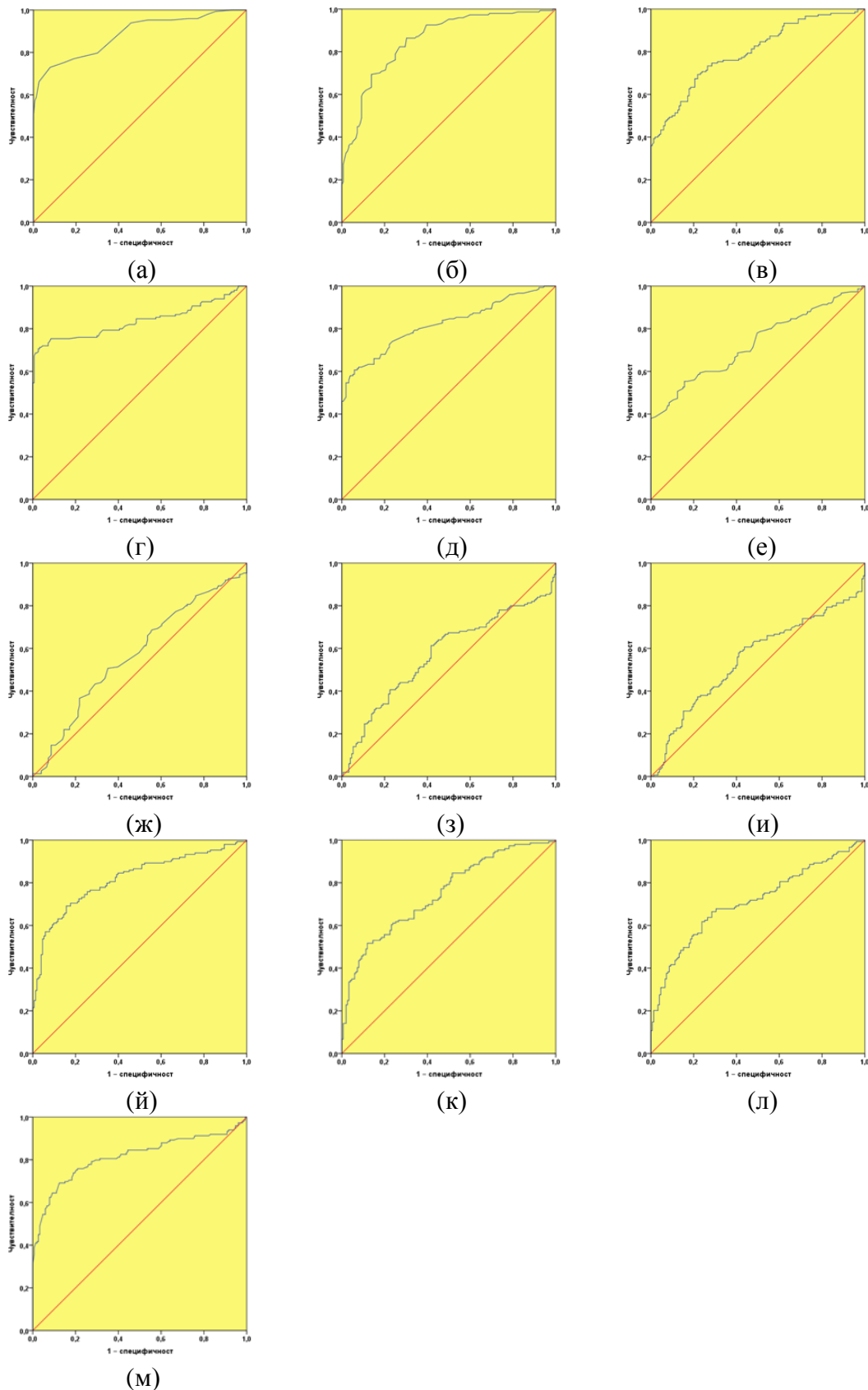
Таблица 43: Корелационни коефициенти между общия белтък в урината и някои показатели

Показател	Общ белтък в урината
Възраст (години)	0,086
Давност на заболяването	0,530***
ACR	0,444***
Цистатин С	0,427***
Креатинин в серум	0,377***

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

Общият белтък в урината най-добре корелира с давността на хипертонията ($r=0,530$) и ACR ($r=0,444$). Отново корелацията с цистатин С е по-голяма от тази с креатинина ($r=0,427$ към $r=0,377$) (табл. 43).

ROC кривите (фигура 21) ясно демонстрират диагностичната значимост на изследваните показатели. От тях се вижда, че белтъчните показатели (албумин, ACR, ОБ и PCR) са с по-голяма акуратност от ГФ. От друга страна, от използваните четири формули за изчисление на ГФ, тези с участието на цистатин С са със значимо по-голяма площ под кривата от тези с участието на креатинина (0,817 към 0,572). Същото се потвърждава и от чувствителността, специфичността и прецизността, които са с по-високи проценти с цистатин С (таблица 45) спрямо креатинина. Статистически значими прагови стойности се установяват за албумин и общ белтък в урината, ACR, PCR, LDL-C, TC, TG. Според ГФ, изчислена с комбинираната формула, хипертониците се разпределят, както следва: ГФ >90 mL/min/m² са 55 болни, 36,9%, от 60 до 89 са 84 болни, 56,4%, от 45 до 59 са 8 болни, 5,4%, от 30 до 44 са 5 болни, 1,3%. С ГФ < 60 mL/min/m² са 13 болни, 8,6%. Най-голям процент от болните са в групата с ГФ от 60 до 89 mL/min/m², 84 болни, 56,4%. При избора на прагова величина критерии за оптимизация са висока чувствителност, специфичност и прецизност.



Фигура 21: ROC крива за албумин (площ под кривата 0,884, $p < 0,001$) (а); общ белтък (площ под кривата 0,854, $p < 0,001$) (б); ACR (площ под кривата 0,797, $p < 0,001$) (в); LDL-C (площ под кривата 0,836, $p < 0,001$) (г); TC (площ под кривата 0,821, $p < 0,001$) (д); TG (площ под кривата 0,729, $p < 0,001$) (е); серумен креатинин (площ под кривата 0,571, $p = 0,032$) (ж); ГФ с креатинин (MDRD) (площ под кривата 0,571, $p = 0,032$) (з); ГФ с креатинин (СКР-EPI) площ под кривата 0,552, $p = 0,119$) (и); ГФ с цистатин С (площ под кривата 0,818, $p < 0,001$) (й); ГФ с комбинираната формула (площ под кривата 0,710, $p < 0,001$) (к); PCR (площ под кривата 0,750, $p < 0,001$) (л); серумен цистатин С (площ под кривата 0,815, $p < 0,001$) (м).

Според получените стойности на критериите за валидизация, като най-добър показател за отграничаване на хипертониците от контролите е албумина в урина с чувствителност 93% и прецизност 74%, следван от общия белтък чувствителност 86% и прецизност 78% и ACR с 81% и 67%. Най-ненадежден е показателят ГФ с формулата MDRD с чувствителност 80% и прецизност 50% (таблица 45).

Таблица 44: Сравнителен анализ на възрастта и давността на заболяването според нивата на албумина в урината

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

При категоризиране на албуминурията, като A1, A2 и A3 се установява, че с нормален или леко увеличен албумин в урината A1 (<30 mg/l) са 89 от хипертониците (60,1%) и с албуминурия A2 (микроалбуминурия) с 30 – 300 mg/l са 59 от болните (39,9%) и без нито един болен с албуминурия A3 (макроалбуминурия >300 mg/l). Нормална, албуминурия A1 е по-честа при по-младите болни и с по-ниски стойности на систоличното и диастоличното налягане (табл. 44). При хипертониците с ГФ <60 mL/min/1.73 m² са 13 болни, 8,6%, докато с албуминурия A2 са 59 болни, 39,9%, следователно установяваме по-често патологична албуминурия, отколкото намалена ГФ.

Таблица 45: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на хипертониците от здравите индивиди

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

На таблица 46 се наблюдава значима, силна до умерена обратнопропорционална корелация между ГФ и увеличението на лабораторните показатели с изключение на ВМІ. В най-висока степен е обратната корелация на ГФ с АСR, РСR и давност на хипертонията и нивото на кръвното налягане. При определяне на ГФ само с цистатин С и с комбинираната формула (цистатин С и креатинин) корелационните коефициенти са по-големи ($r = -0,954$ и $r = -0,760$), отколкото с креатинина.

Таблица 46: Корелационни коефициенти между ГФ и основните показатели.

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

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

От таблица 47 се вижда, че има положителна значима корелация на систоличното кръвно налягане с албумина в урината ($r = 0,322$, $p < 0,001$) и АСR ($r = 0,217$, $p < 0,01$) и обратнопропорционално с ГФ оценена с участието

на цистатин С ($r=-0,191$, $p<0,05$). Диастоличното артериално налягане леко корелира само с албумина в урината ($r=0,174$, $p<0,05$).

Таблица 47: Корелационни коефициенти между САН, ДАН и показателите албумин в урината, АСР и гломерулната филтрация при хипертониците

Показатели	САН	ДАН
Албумин в урината	0,322***	0,174*
АСР	0,217**	0,065
eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С	-0,112	-0,009
eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С	-0,106	-0,009
eGFR (СКД-EPI) само с цистатин С	-0,198*	0,030
eGFR (СКД-EPI) с креатинин и цистатин С	-0,191*	0,008

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

5.2.4 Диабетици с хипертония

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

Представените резултати на таблица 49 показват данните от вариационния анализ на изследваните показатели. Установяваме, че средните аритметични стойности са статистически значимо променени спрямо клинично здравите лица. Протеиновите показатели АСР и албумин

в урината, PCR и ОБ в урината са многократно увеличени, по-силно отколкото при диабетици без хипертония и при хипертоници. ACR е увеличен над 20 пъти, албумина в урината над 3,5 пъти, PCR над 7 пъти и ОБ около 2 пъти. От липидните показатели най-изразено е увеличението на LDL-C с 61%. Увеличени са също глюкозата, гликирания хемоглобин и пикочната киселина. Статистически значимо е намалението на ГФ, изчислена по формулите включващи цистатин С.

Таблица 48: Вариационен анализ на възрастта и антропометричните характеристики при диабетици с хипертония

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

И в групата на диабетици с хипертония се наблюдават незначими, полови разлики за албумина и общия белтък в урината с по-високи стойности за мъжете в сравнение с жените (49,81 към 41,75 и 107,25 към 102,86) (таблица 50).

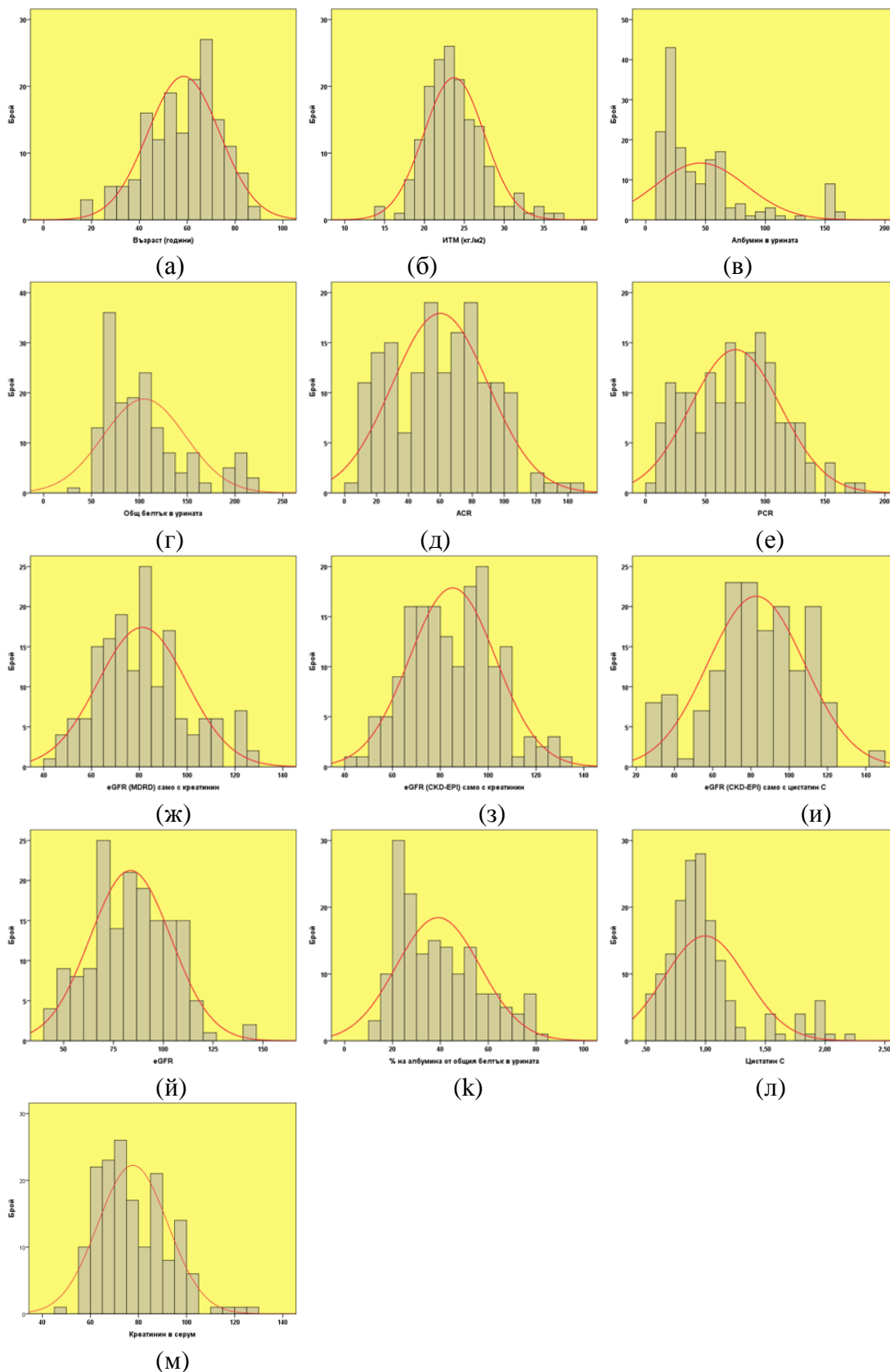
От представените на фигура 22 резултати се вижда, че Гаусово разпределение показва само ГФ, изчислена с всички формули, а останалите имат не Гаусово разпределение с изместване на кривата в различни посоки.

Таблица 49: Вариационен анализ на изследваните показатели при диабетици с хипертония

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

Таблица 50: Сравнителен анализ на албумин и общ белтък в урината при двата пола

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



Фигура 22: Честотно разпределение при диабетици с хипертония по различни показатели (тест на Колмогоров-Смирнов): възраст, $p=0,016$) (а); BMI, $p=0,003$ (б); албумин в урината, $p<0,001$ (в); общ белтък в урината, $p<0,001$ (г); ACR, $p=0,034$ (д); PCR, $p=0,034$ (е); eGFR (MDRD), $p=0,079$ (ж); eGFR (CKD-EPI) само с креатинин, $p=0,200$ (з); eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С, $p=0,200$ (и); процент на албумина от общия белтък в урината, $p<0,001$ (й); цистатин С, $p<0,001$ (к); креатинин в серум, $p<0,001$ (л); креатинин в серум, $p<0,001$ (м)

Таблица 51: Корелационни коефициенти между албумина в урината и някои показатели

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

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

Таблица 52: Корелационни коефициенти между общия белтък в урината и някои показатели

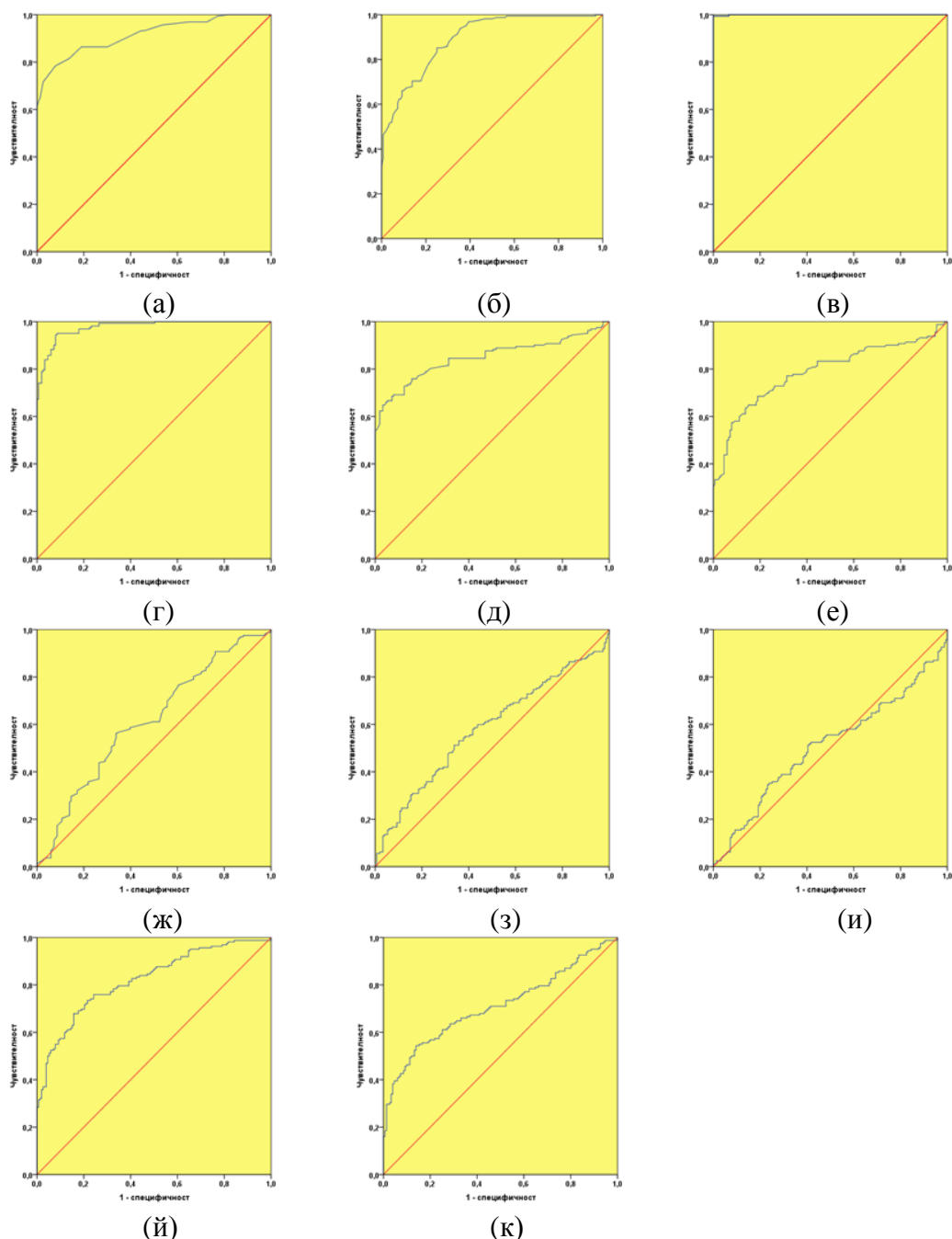
Показател	Общ белтък в урината
Възраст (години)	0,106
Давност на заболяването	0,726***
ACR	0,305***
Цистатин С	0,540***
Креатинин в серум	0,248**
Глюкоза	0,176*
Гликиран хемоглобин	0,424***

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

На таблица 51 и 52 са демонстрирани корелационните зависимости на албумина и ОБ в урината с останалите показатели. Албуминът в урината показва доста силна, положителна корелация с ОБ ($r=0,814$, $p<0,001$), с давността на заболяването ($r=0,733$, $p<0,001$), ACR ($r=0,263$, $p<0,01$). Корелацията на албумина с цистатин С в серума е по-висока ($r=0,514$, $p<0,001$) от тази с креатинина ($r=0,232$, $p<0,01$). Добра корелация е регистрирана и с останалите показатели без ВМІ. ОБ е във висока

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

От представените на фигура 23 ROC криви се демонстрира диагностичната ефективност на изследваните показатели. При диабетици с хипертония особено полезна показател е АСR с площ под кривата 1 при $p<0,001$, следван от албумин в урината с площ под кривата 0,915 при $p<0,001$. ROC кривите за ГФ отново дават предимство на уравненията с цистатин С самостоятелно (с площ под кривата 0,821 при $p<0,001$) и комбинираната формула с цистатин С и креатинин (с площ под кривата 0,710 при $p<0,001$), спрямо тези само с креатинин (с площ под кривата 0,583 при $p=0,012$ и с площ под кривата 0,509 при $p=0,772$). На таблица 53 са дадени характеристиките чувствителност, специфичност, предиктивни стойности и прецизност. Като най-добри показатели за отграничаване на диабетици с хипертония от контролите са АСR с чувствителност 100%, специфичност 93% и прецизност 97%, следвани от РСR с чувствителност 97%, специфичност 82% и прецизност 90. Отново впечатлява, че чувствителността, специфичността и прецизността в тази група са много по-високи в сравнение с групата на диабетици без хипертония и болните с есенциална хипертония. При определяне на ГФ с четирите формули, чувствителността и специфичността са много близки, но по-ниски от тези на белтъчните показатели.



Фигура 23: ROC криви за определяне праговата им стойност при отграничаването на имащите диабет + хипертония от контролната група: а/ албумин в урината (площ под кривата 0,915, $p < 0,001$); б/ общия белтък в урината (площ под кривата 0,893, $p < 0,001$); в/ ACR (площ под кривата 1,000, $p < 0,001$); г/ PCR (площ под кривата 0,977, $p < 0,001$); д/ общ холестерол (площ под кривата 0,849, $p < 0,001$); е/ цистатин С (площ под кривата 0,788, $p < 0,001$); ж/ креатинин в серум (площ под кривата 0,788, $p = 0,001$); з/ eGFR (MDRD) с креатинин (площ под кривата 0,583, $p = 0,012$); и/ eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (площ под кривата 0,509, $p = 0,772$); й/ eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (площ под кривата 0,821, $p < 0,001$); к/ eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (площ под кривата 0,710, $p < 0,001$).

Средните нива на ГФ определени с 4-те формули са по-ниски от тези в контролната група (таблица 49). С ГФ определена с комбинираното уравнение $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ са 63 болни, 38,9%; с ГФ от 89 до 60 mL/min/1.73 m^2 са 78 болни, 48,1%; от 59 до 45 са 18 болни, 11,1% и от 30 до 44 mL/min/1.73 m^2 са 3 болни, 1,9%. С ГФ под 60 mL/min/1.73 m^2 са 21 болни, 13%. И в тази група болни по-често регистрираме албинурия А2 (85 болни, 52,4%) и увеличение на АСР в сравнение с намалението на ГФ $<60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, 21 болни, 13%).

Таблица 53: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на диабетици с хипертония от здравите индивиди

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

С албуминурия А1 са 77 болни (47,5%) и с албуминурия А2 (микроалбуминурия) са 85 болни (52,46%) (таблица 54). Албуминурия А2 се наблюдава по-често при по-възрастните и при тези с по-голяма давност на диабета и хипертонията. Нямаме болни с албуминурия А3.

Таблица 54: Сравнителен анализ на възрастта и давността на заболяването според нивата на албумин в урината

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

Корелационните зависимости между ГФ и изследваните показатели са показани на таблица 55 чрез съответните корелационни коефициенти. Всички статистически значими корелации са обратнопропорционални. Най-високи са коефициентите на ГФ оценена с комбинираната формула (цистатин С и креатинин) с общия белтък ($r=-0,520$), с давност на заболяването ($r= - 0,512$), с албумин ($r= -0,495$), с HbA1c ($r= -0,424$) и с ACR ($r=-0,345$, $p<0,001$).

Таблица 55: Корелационни коефициенти между гломерулната филтрация и някои показатели

Показатели	eGFR (MDRD) само с креатинин	eGFR (CKD- EPI) само с креатинин	eGFR (CKD- EPI) само с цистатин С	eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С
Албумин в урината	-0,237**	-0,257**	-0,506***	-0,495***
Общ белтък в урината	-0,274***	-0,272***	-0,531***	-0,520***
ACR	-0,288***	-0,289***	-0,311***	-0,345***
PCR	-0,288***	-0,289***	-0,311***	-0,345***
Възраст	-0,406***	-0,609***	-0,319***	-0,440***
ВМІ	-0,118	-0,087	-0,253**	-0,229**
Давност на заболяването	-0,279***	-0,268**	-0,529***	-0,512***
НвА1с	-0,269**	-0,292***	-0,396***	-0,424***
Глюкоза	-0,215**	-0,236**	-0,306***	-0,310***
LDL-холестерол	-0,164*	-0,199*	-0,202**	-0,217**
Общ холестерол	-0,203**	-0,235**	-0,266**	-0,276***
Триглицериди	-0,107	-0,087	-0,262**	-0,234**
Цистатин С	-0,339***	-0,321***	-0,959***	-0,835***
Креатинин в кръвен серум	-0,685***	-0,642***	-0,268**	-0,458***

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

5.2.5 Хронични първични бъбречни заболявания (ХПБЗ)

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

Таблица 56: Вариационен анализ на възрастта и антропометричните показатели при диабетците

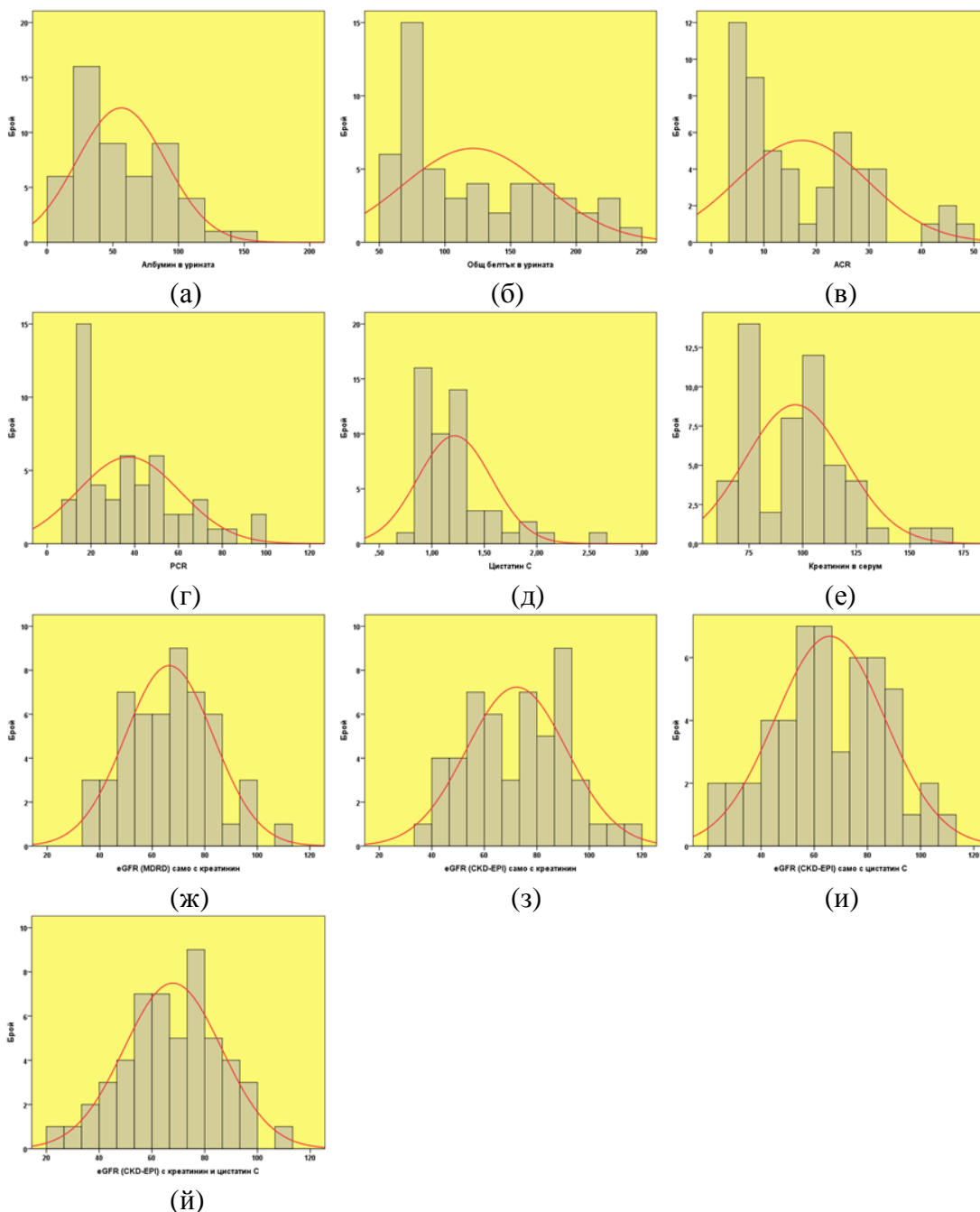
Показател	Брой	\bar{X}	SD	Median	Min	Max
Възраст (години)	152	55,12	14,13	56,00	24,00	82,00
Ръст (см.)	152	167,34	7,73	165,50	146,00	188,00
Тегло (кг.)	152	74,18	18,35	71,50	47,00	140,00
ИТМ (кг/м ²)	152	26,33	5,42	25,96	15,89	43,21

Средната възраст, тегло и ВМІ са по-големи в сравнение с контролите (табл. 56).

Само креатининът в серума и ГФ, изчислена по 4-те формули, имат Гаусово разпределение (фигура 24). Останалите показатели имат не Гаусово разпределение. Хистограмата на някои от показателите е изместена леко в дясно.

Всички изследвани показатели показват статистически значими промени на средните стойности спрямо контролите (табл. 57). Това увеличение е за цистатин С 64,8%; за серумния креатинин 25,6%; албумина в урината 4,4 пъти; за АСR 7 пъти; за РСR 3,5 пъти, за общ холестерол 22,45% и за пикочната киселина 32,9%. ГФ при болните от ХПБЗ е значимо намалена спрямо контролите. В проценти това намаление е с MDRD формулата само с креатинин 14,7%, с СКD-EPI само с креатинин 17,3%, само с цистатин С 66,5% и с комбинираната формула 43,6%.

Корелацията между креатинин и цистатин С в серума е умерена и правопрпорционална (Spearman's, $\rho=0,420$, $p=0,002$). Корелацията на албумина и ОБ в урината с останалите показатели е представена на таблица 58



Фигура 24: Честотно разпределение на болните с ХПБЗ по: а/ албумин в урината (не Гаусово, $p=0,011$); б/ общ белтък в урината (не Гаусово, $p<0,001$); в/ ACR (не Гаусово, $p<0,001$); г/ PCR (не Гаусово, $p<0,001$); д/ цистатин С (не Гаусово, $p<0,001$); е/ креатинин в серум (Гаусово, $p=0,059$); ж/ eGFR (MDRD) само с креатинин (Гаусово, $p=0,200$); з/ eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (Гаусово, $p=0,200$); и/ eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (Гаусово, $p=0,200$); й/ eGFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (Гаусово, $p=0,200$).

Таблица 57: Вариационен анализ на изследваните показатели при имащите ХПБЗ

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

Таблица 58: Корелационни коефициенти между албумин и общ белтък в урината с основните показатели.

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

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

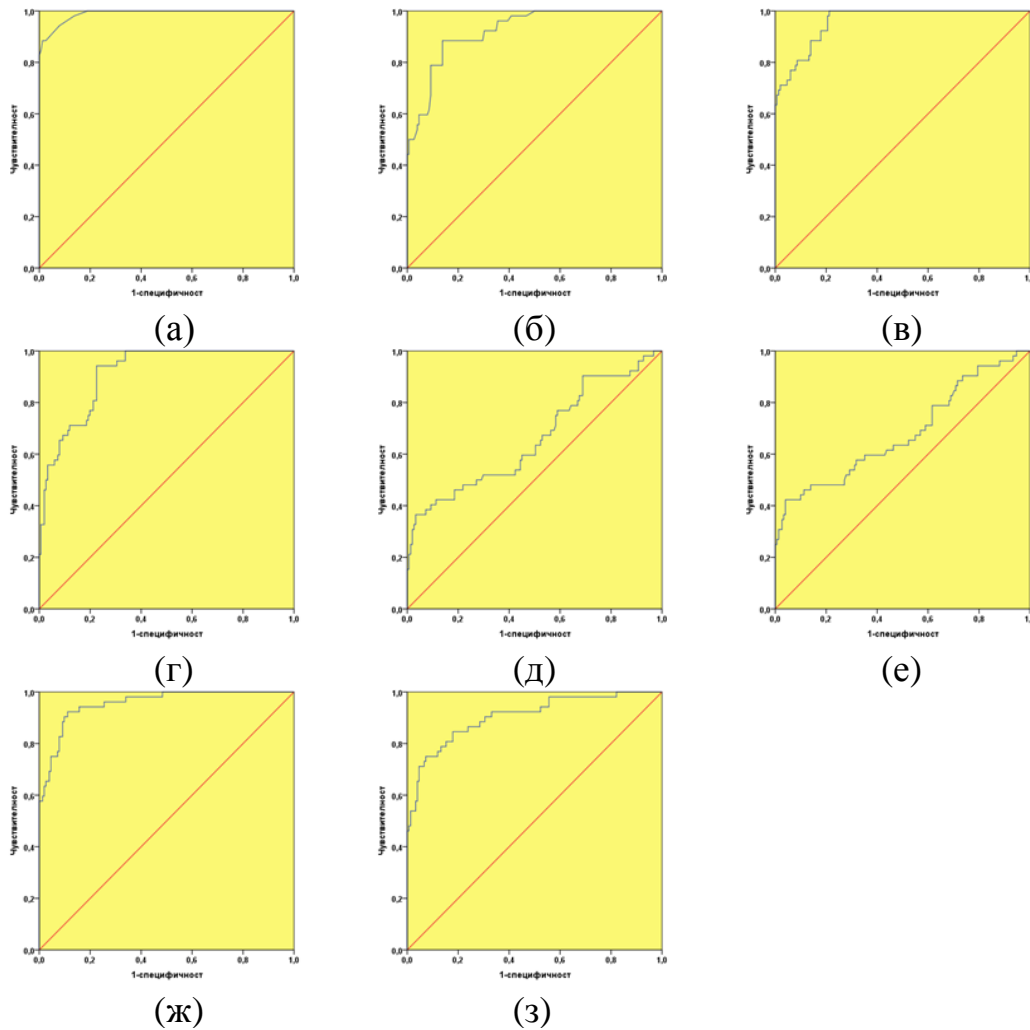
Резултатите от табл. 58 показват, че албуминът в урината най-силно правопрпорционално корелира с ОБ в урината ($r=0,939$, $p < 0,001$) и след това с ACR ($r=0,822$, $p < 0,001$), с PCR ($r=0,724$, $p < 0,001$), с давност на заболяването ($r=0,650$, $p < 0,001$) и обратнопропорционално с ГФ (по последните две формули), като малко по-силна е корелацията с ГФ, изчислена по формулата само с цистатин С ($r=-0,502$, $p < 0,001$). Корелацията на ОБ в урината със същите показатели демонстрира подобни резултати (табл. 58).

Таблица 59: Корелационни коефициенти между ГФ и основните показатели

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

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

Представените резултати на таблица 59 показват обратнопропорционални корелации между ГФ, изчислена с различните формули и представените показатели: по-силна е корелацията на ГФ с формулата само с цистатин и с комбинираната в сравнение с уравненията само с креатинин при давност на заболяването ($r = -0,849$ спрямо $r = -0,637$), както и с възрастта на болните ($r = -0,522$ спрямо $r = -0,367$). По отношение на протеиновите показатели корелацията е най-висока с ACR, следва PCR и ОБ.



Фигура 25: ROC криви на: а/ албумина в урината (площ под кривата 0,989, $p < 0,001$); б/ общия белтък в урината (площ под кривата 0,923, $p < 0,001$); в/ ACR (площ под кривата 0,959, $p < 0,001$); г/ PCR (площ под кривата 0,912, $p < 0,001$); д/ eGFR (MDRD) само с креатинин (площ под кривата 0,660, $p = 0,001$); е/ eGFR (CKD-EPI) само с креатинин (площ под кривата 0,681, $p < 0,001$); ж/ eGFR (CKD-EPI) само с цистатин С (площ под кривата 0,955, $p < 0,001$); з/ GFR (CKD-EPI) с креатинин и цистатин С (площ под кривата 0,905, $p < 0,001$).

Представените ROC криви (фиг. 25) показват диагностичната акуратност на изследваните белтъчни показатели в урината. Статистически значими прагови стойности се установяват почти за всички показатели. При изборът на прагова величина критериите за оптимизация са висока чувствителност, специфичност и прецизност. С най-голяма диагностична акуратност е албуминът в урината (а), чиято площ под кривата се доближава до единица (0,989, $p < 0,001$) и ACR (в) (0,959, $p < 0,001$). При

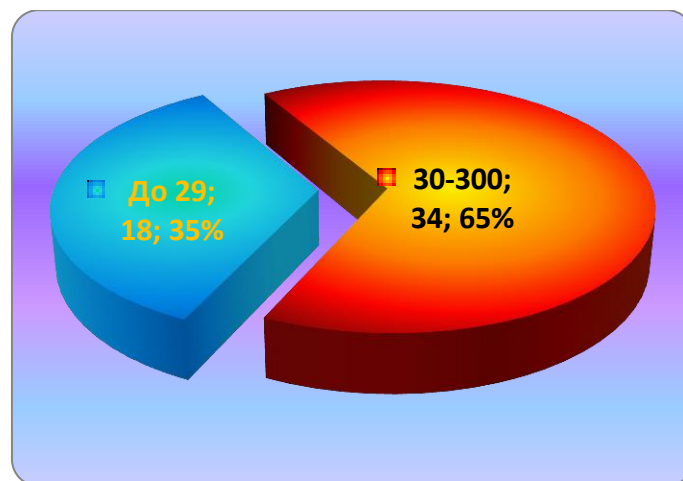
болните с ХПБЗ диагностичната акуратност на ГФ е много близка до тази на белтъците в урината. От 4-те уравнения за оценка на ГФ най-висока стойност показва това, което е само с цистатин С (g) (площ под кривата 0,955, $p < 0,001$) и комбинираната формула с цистатин С и креатинин (h) (0,905, $p < 0,001$).

Като най-добър показател за отграничаване на болните с ХПБЗ от клинично здравите индивиди се установи албуминът в урината с чувствителност 94%, прецизност 93% и специфичност 92%, следван от ACR с чувствителност 98%, прецизност 84% и специфичност 86%. ГФ с уравнението само с цистатин С е с чувствителност 94%, прецизност 87% и специфичност 84%, следвано от комбинираната формула с цистатин С и креатинин с чувствителност 85%, прецизност 83% и специфичност 82%. ГФ определена само с креатинин е с най-ниска чувствителност 81% и прецизност 45%. Положителната и отрицателната предиктивни стойности отново са най-високи за албумина и ACR (табл. 60).

Таблица 60: Прагови величини на изследваните показатели и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на имащите ХПБЗ от здравите индивиди

Показател	Прагова величина	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	Положителна предиктивна стойност (%)	Отрицателна предиктивна стойност (%)	Прецизност (%)
Албумин в урината	$\geq 18,5$	94	92	80	98	93
Общ белтък в урината	$\geq 73,5$	88	86	69	96	87
ACR	$\geq 3,53$	98	79	61	99	84
PCR	$\geq 13,61$	94	78	59	98	82
eGFR (MDRD) само с креатинин	$\leq 81,54$	83	33	30	85	46
eGFR (СКD-EPI) само с креатинин	$\leq 91,75$	81	33	29	83	45
eGFR (СКD-EPI) само с цистатин С	$\leq 94,81$	94	84	67	98	87
eGFR (СКD-EPI) с креатинин и цистатин С	$\leq 85,45$	85	82	62	94	83

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



Фигура 26 : Честотно разпределение на болните с албуминурия

От фиг. 26 става ясно, че с албуминурия А1 са 18 болни, 35%, а с албуминурия А2 - 34 болни, 65%. Абнормална албуминурия А2 установяваме при повече болни спрямо тези с намалена ГФ $< 60 \text{ mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$, 18 болни, 34,6%.

5.2.6 Сравнителен анализ на отделните групи

Представените в този раздел резултати са обобщаващи за 4-те групи в сравнение с клинично здравите лица. На табл. 61 е представено разпределението по пол, средни стойности на възраст и антропометрични характеристики за отделните групи и общо.

Таблица 61: Изследван контингент

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

Резултатите на таблица 62 показват, че е налице статистически значима албуминурия при всички групи спрямо клинично здравите лица. Тя е предимно албуминурия А2 и е най-висока при болни с ХПБЗ ($\bar{X}=56,35\pm33,93$) и най-ниска при хипертониците ($\bar{X}=31,26\pm19,37$). Същата характеристика показва и протеинурията, най-висока при ХПБЗ ($\bar{X}=121,5\pm53,92$) и най-ниска при хипертониците ($\bar{X}=89,1\pm32,13$). Екскрецията на албумина с урината остава в референтните граници само при 3,8% от ХПБЗ, при 32% от диабетичите с хипертония, при 31,1% от хипертониците и при 24,7% от диабетичите без хипертония. АСR е най-силно увеличено при диабетичи с хипертония, следвано от ХПБЗ. Процентът на албумина от общия белтък е увеличен при всички групи спрямо контролите, както и АСR и РСR. Цистатин С и креатинин в кръвен серум са най-високи при ХПБЗ ($\bar{X}=1,22\pm0,35$ и $\bar{X}=96,52\pm23,43$ съответно). Общият холестерол и LDL-С са най-високи в групата диабет с хипертония.

Таблица 62: Сравнителен анализ на изследваните групи по някои показатели

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

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

Таблица 63: Сравнителен анализ на изследваните групи по ГФ

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

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

ГФ установена с различните формули в отделните групи е дадена в таблица 63. На нея може да се види разликата в ГФ установена с различните уравнения. Както се и очаква най-висока е ГФ в контролната група оценена с формулата само с цистатин С ($\bar{X} = 109,81 \text{ mL/min/1.73 m}^2$). При болните най-ниска е ГФ в групата на ХПБЗ ($65,94 \text{ mL/min/1.73 m}^2$). Тук много ясно проличава надценяване и подценяване на ГФ при изчисление с формули с участието на креатинина (MDRD и СКD-EPI) спрямо уравненията с цистатин С. Стандартните отклонения при различните групи болни са най-големи при ГФ определена с формулата

само с цистатин С. Това показва, че честотното разпределението с цистатин С е най-широко и включва от най-ниски до най-високи стойности.

Половата разлика за ГФ е представена на таблица 64. Статистически значима е половата разликата на ГФ с по-високи стойности за мъжете в контролната група, при хипертониците и при диабетиците с хипертония.

Всички статистически достоверни корелации са правопрпорционални (табл. 65). При контролната група липсва корелацията между креатинин и цистатин С в серума ($r=0,083$, $p \geq 0,05$), но с останалите групи корелацията става все по-силна - при хипертоници ($r=0,221$, $p < 0,01$), при диабетици ($r=0,246$, $p < 0,01$), при диабетици с хипертония ($r=0,328$, $p < 0,01$) и при болни с ХПБЗ ($r=0,420$, $p < 0,001$).

На табл. 66 се вижда, че:

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

Таблица 64: Сравнителен анализ на ГФ при двата пола

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

Таблица 65: Корелационен анализ между креатинин и цистатин С в серума при различните групи

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

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

Таблица 66: Погрупов сравнителен анализ на албумин, общ белтък в урината и ACR при двата пола

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

Таблица 67: Разпределение по нива на гломерулна филтрация и групи на изследване

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

Разпределението на ГФ според класифицирането на стадията на ХБЗ е представено на таблица 67. Тук отново се демонстрира разликата между отделните формули за изчисляване на ГФ. Още в контролната група проличава тази разлика. В контролната група броят на индивидите с ГФ > 90 mL/min/1.73 m² са 23, 15,2% (с MDRD); 53, 35,1% (с СКД-ЕРІ с креатинин); 134, 87,6% (СКД-ЕРІ само с цистатин С); и 111, 73,5% (СКД-ЕРІ с креатинин и цистатин С). Всички контроли са с ГФ >60 mL/min/1.73 m². При контролите съгласно първите две уравнения по-голям е броят на индивидите с ГФ 60 - 89 mL/min/1.73 m². Според последните две формули повече от клинично здравите лица са с ГФ >90 mL/min/1.73 m². Подобни разминавания се установяват и при болните (таблица 67). При класифициране на болните съгласно приетите норми за ГФ при ХБЗ с комбинираната формула установяваме: Степен IIIa са 28 болни с диабет без регистрирана хипертония, 18,4%; 8 болни с хипертония, 5,4%; 18 болни с диабет и хипертония, 11,1% и 12 болни с ХПБЗ, 23,1%. Степен IIIb са 4 болни с диабет без хипертония, 2,6%; 5 болни с хипертония, 1,3%; 3 болни с диабет и хипертония, 1,9% и 5 болни с ХПБЗ, 9,6%. Степен IV има само един болен с ХПБЗ, 1,9%.

6 ОБСЪЖДАНЕ

Това проучване е замислено като повод за увеличение и разширение на използваните маркерите у нас за диагноза на ХБЗ в резултат на диабет с и без хипертония, есенциална хипертония и различни хронифицирани първични бъбречни заболявания. То включва **669 участници, от които 153 клинично здрави лица (контролна група) и 516 болни**. За реализацията трябваше да въведем достатъчно чувствителни и специфични методи за определяне на цистатин С в кръвен серум, албумин и общ белтък в урината, както и ACR, и PCR. При това тези методи следваше да имат международно признание, да са достъпни и приложими, без да изискват допълнително апаратно оборудване. За оценка на ГФ ни бе необходим освен креатинина и нов биомаркер. За такъв предпочетохме **цистатин С**. За определянето му в кръвен серум се спряхме на имунотурбидиметричния метод (**PEIA**, particle-enhanced turbidimetric immunoassay), с тест на фирмата Abbot Laboratoies Diagnostics и с апарата Architect с8000. При валидиране на метода установихме, че калибрационната крива (фиг. 15) е линейна в границите от 0.4 до 8.0 mg/l. Невъзпроизводимостта в серия за концентрации на три нива, 0.60, 0.88 и 1.13 mg/l е CV 3.82, 2.63 и 2.36 (таблица 19). Невъзпроизводимостта между серии за същите концентрации е CV 5.29, 3.45 и 3.04 (таблица 20). Аналитичната откриваемост за различните концентрации е средно 96% и варира от 93 до 102%. Получените резултати ни дават правото да приемем, че методът е много добър. Нашите резултати са много близки до тези съобщени от други автори (95, 143). Този метод е бърз, автоматизиран, високо чувствителен и специфичен. Полученият сигнал се основава на разсейването на светлината от турбидиметричните частици (антиген-антитяло). Поради по-голямата си достъпност и по-ниска себестойност, той се предпочита пред имунонефелометрията и в международен порядък (66, 84, 128).

Използвайки метода PETA, цистатин С може да се изследва с помощта на различни видове рутинни автоматични биохимични анализатори. Така анализът става по-бързо и на по-ниска цена от нефелометрията и намира все по-широко приложение в клиничните лаборатории. При използването на този метод интерференцията от хемолиза, хипербилирубинемия и липидемия е сведена до минимум, но въпреки това ние не използвахме такива проби. Наскоро Mayo Clin Lab (128) препоръчват въвеждането на метода PETA за определяне на цистатин С в рутинната практика с рекомбинантен референтен чист протеин. Този метод е отлична алтернатива на нефелометричния метод за определяне на цистатин С в кръвен серум и то на по-ниска цена. За проследяване състоянието на гломерулната филтрационна мембрана ни бяха необходими протеинови биомаркери. Хиперфилтрация, микроалбуминурия (начална нефропатия) и макропротеинурия (изявена нефропатия) характеризират клинични стадии на ХБЗ. Въведените наскоро чувствителни анализи за откриване на албумин и ОБ в урината, като радиоимуноанализите и имунотурбидиметрията улесниха характеризирането на албуминурия А1, А2 и А3. Затова за определяне на **албумина в урината** се спряхме на **имунотурбидиметричния метод** с тестове Multigent microalbumin на Architect, който се отчита на същия апарат Architect с8000. Този метод е по-бърз от нефелометричния, не изисква допълнителна апаратура и може да бъде отчетен на всеки спектрофотометър. При валидиране на метода, ние установяваме концентрацията на албумина в урината по 6 точкова калибрационна крива (фигура 16). Тя е линейна в границите от 5.0 до 500 mg/l. Невъзпроизводимостта в серия за концентрации 30mg/l и 90 mg/l е CV 5.61 и 3.09 (таблица 21). Невъзпроизводимостта между серии за същите концентрации е CV 12.89 и 5.41 (таблица 22). Аналитичната откриваемост за различните концентрации е средно 95%. Получените от нас резултати за имунологичния метод за албумин в урината са много добри и са много

близки до тези, съобщени от други автори (41, 69, 72). Нужно бе да решим още един спорен въпрос, а именно какъв **вид урина** да се използва за определяне на албумина и ОБ, ACR и PCR – 24 часова, сутрешна или случайна. Доскоро се приемаше, като „златен стандарт“ 24 часова урина. Събирането на тази урина е бавно, трудоемко, подложено на грешки в над 30% (88, 140). В съгласие и с други автори, както и с препоръките на KDOQI (92, 164), ние предпочитаме използването на средна порция от еднократна сутрешна урина. Това е лесно, бързо и освободено от влиянието на хидратацията, циркадните ритми и други. При това е установена силна корелация между регулираната от креатинина албуминурия в случайни проби и 24-часови. Освен това въведохме съотношение албумин към креатинин (**ACR**), което се приема, че има 100% чувствителност и специфичност за албуминурия A2 (микроалбуминурия) (18). Следователно, отношението ACR получено в ранна сутрешна проба е подходящ индекс за проверка на албуминурия A2 поради лесно събиране, ниска цена и висока чувствителност. Оценка на отношението ACR е широко използвано, защото то има по-малък вариационен коефициент от екскрецията на албумина в урината (73, 140). Индивидуалната вариация (CV_i) на албумин в урината стига до 28-37%, а тази на ACR е значимо по-малка (10-12%). Среден CV <15% за албумина и <10% за ACR се смята за приемлив от NKDEP/IFCC. Освен това е важно да отбележим, че над 85% от лабораториите по света определят албумина имунотурбидиметрично. За определяне на ОБ в урината въведохме и валидирахме турбидиметричния метод с бензетонин хлорид с тест на фирмата Architect с8000. За разлика от албумина, ОБ в урината е съставен от много различни белтъци и това усложнява избора за подходящ метод. Различни методи могат да реагират непропорционално за всеки белтък. Измерването на ОБ е по-малко стабилно при ниски нива на протеини и не е достатъчно чувствително, за да открива всички клинично значими

концентрации в урината. Белтък в урината може да се определи турбидиметрично с трихлороцетна киселина, със сулфосалицилова киселина или с бензетониев хлорид; с биуретовата реакция, със селективни бои (Coomassie Brilliant Blue, Pyrogallol red, или Ponceau S). Ние предпочетохме турбидиметричния метод с бензетониев хлорид, който е автоматизиран, лесен, чувствителен и линеен в широки граници, като определя почти всички белтъци в урината. Протеинурията заедно с АУ са признати, като независими рискови фактори за сърдечно-съдови и бъбречни заболявания и като предиктор за органно увреждане. Хипералбуминурията и хиперпротеинурията имат значителна стойност в оценка на ефективността от лечението и прогресия на заболяването. Въведохме и използвахме за оценка на протеинурията показателя протеин/креатинин (**PCR**). Както и при АСР вариациите в PCR са много по-малко, спрямо екскрецията на ОБ с урината, затова използваме и двата показателя. За АСР получихме по-добра специфичност и предиктивна стойност от PCR. За определяне на **креатинина** в кръвен серум и урина използваме кинетичния метод на Jaffe, макар някои да предлагат ензимния метод. Разликата между кинетичния и ензимния метод по отношение на чувствителност и специфичност е статистически незначима (123). Корелацията е много висока ($r=0,98$), независимо от липсата или присъствието на много интерфериращи субстанции (123). В рутинната практика е за предпочитане кинетичния метод на Jaffe и ние го приложихме поради ефективността на разходите, което е особено важно за нашата страна.

За оценка на ГФ използвахме ендогенните маркери, поради сложността и големите разходи за използването на екзогенни маркери (инулин), креатинин и цистатин С, определена чрез четири различни формули модифицирани и осъвременени през 2009 - 2012 г. и препоръчани от NKD и KDOQI (80, 92, 94, 114, 145, 164). Първата от тези формули е

MDRD, добре позната и широко използвана. Последните години е критикувана заради креатинина. Тя се засяга от флуктуации в синтезата на креатинина и водния баланс. Тя дава лъжливо по-високи стойности за ГФ при гладуване и свръх хидратация и лъжливо по-ниски стойности при увеличен серумен креатинин. Тази формула е подходяща за лица с креатининова концентрация в референтната област и за лица на възраст от 18 до 70 г. Тя е неприложима при лица с нестабилна креатининова концентрация, с повишена мускулна маса, на диета, при ампутации или параплегия, обезитас, вегетарианци, анорекция и други. Следващата формула е **СКД-ЕПІ с креатинин**. Това е по-ново уравнение, публикувано през 2009. То предлага някои подобрения за ГФ между 60 и 120 ml и е по-точно от MDRD. Формулата СКД-ЕПІ се приема за по-универсална, която дава по-малко подценяване на ГФ при индивиди с нормална бъбречна функция. Тя обаче също е критикувана заради проблемите с креатинина. Креатининът е с физиологични ограничения, като маркер за гломерулна филтрация, особено в ранните стадии на ХБЗ. За съжаление, тези двете формули също са ограничени от липсата на валидиране в пълната гама на GFR, към които те се прилагат (18). Уравненията с креатинин надценяват разпространението на ХБЗ. Очаква се при използването на уравнения с цистатин С да бъдат решени някои от тези ограничения. Затова използвахме и трета формула **СКД-ЕПІ само с цистатин**, която има много по-кратка история (15, 18, 68). Тя се предлага, като алтернатива на формулите базирани на серумния креатинин. Има данни, че уравнението само с цистатин С постига поне толкова добър резултат, като тези базирани на креатинина, с малко по-голяма точност. Тя допълва данните от серумния креатинин, макар някои да смятат, че няма статистически значима разлика в диагностична точност на ГФ при използване на формулата само с цистатин С и тези само с креатинин. На последната, четвърта формула **СКД-ЕПІ с креатинин и цистатин** се възлагат най-

много надежди, защото тя използва два ендогенни маркера, с което се елиминират недостатъците на креатинина и на цистатин С при самостоятелното им използване. При това серумната креатининова концентрация е съобразена с пола (80, 81, 145). Затова използвахме четирите формули за да имаме собствено мнение за диагностичната им надеждност. В литературата се спори коя формула за ГФ да се използва, като за основа служи диагностичната стратегия – за скрининг, за специфична клинична индикация, като вторичен тест на база резултати от креатининовия тест или за сравнение на ГФ определена с креатинин. При сравнението на четирите формули установихме най-приемливи резултати с комбинираната формула с цистатин С и креатинин. Нашите резултати са в съгласие с авторите, които дават предимство на комбинираното уравнение (18, 80, 160). Чрез него се изчислява най-точно гломерулната филтрация в целия диапазон.

Следващата ни задача беше да установим **собствени референтни граници** за показателите, които въведохме и които използваме. Колкото и да е трудно и отговорно изработването на референтни стойности (183, 191), предпочитаме да работим с наши и те да бъдат основа за оценка на показателите при болните, за да отговарят най-добре на характеристиките на българската популация по отношение на тегло, антропометрични характеристики, мобилност, хранителни навици и други. Референтните стойности зависят от редица физиологични процеси и множество биологични фактори, които определят характеристиката на всяка популация (19, 24, 191, 194, 195). IFCC-LM публикува международни и национални разработки за референтни граници. Референтната група е това наше проучване се състои от 153 заявили, че са здрави, възрастни доброволци, част от които медицински служители. Всички доброволци попълваха въпросник за здраве и се изключваха, ако са с анамнеза за хронични здравословни проблеми. Всички те са преминали клиничен

преглед преди и след подробно изследване на урина, кръв за хематологичен и биохимичен анализ и други. Целта бе да се направи оценка на аналитичните и клиничните характеристики на експлоатационните качества на цистатин С и албуминурията, и да определят референтни интервали за възрастни. Методите ни за оценка се базират на честотното разпределение на показателите – Гаусово или не Гаусово. Тъй като половите различия могат да окажат влияние на референтни интервали, ние използваме 95% доверителни интервали за горната референтна стойност за подгрупите. Поради значително припокриване в централните диапазони и в доверителните интервали за горните референтни стойности за тези групи, не наблюдаваме клинично значима разлика между тях. Тези индивиди смятащи се за здрави покриват по пол и възраст характеристиките на болните. Честотното разпределение (фиг. 17) по възраст, тегло и ВМІ е нормално, Гаусово. Получените резултати са близки на тези в литературата и са приемливи, като средна стойност, стандартно отклонение и 95% ДИ (таблица 26) (15, 57-59, 141, 191). Въведохме и използваме **за първи път у нас** названията **албуминурия А1, А2 и А3** вместо нормална албуминурия, микроалбуминурия и макроалбуминурия. При всички наши клинично здрави лица албуминурията е А1 с изключение на две възрастни жени, които имат много лека албуминурия А2. Средната стойност на екскретирания албумин в нашата контролна група е 12,92 mg/l и максималната достига до 22 mg/l, а на общия белтък 54,39 mg/l и 109 mg/l съответно. По литературни данни средната стойност на албумина в урината е 10 mg/24h или от 5 до 15 mg/l (69, 104, 158, 226). Много по-точното определяне на албумина и ОБ бе възможно благодарение използването на високо чувствителните имунотурбидиметрични методи. Ние потвърждаваме наскоро публикувани данни на автори, които установяват, че албуминът не е основен компонент на общия белтък, поне

при здрави индивиди (69, 72, 158). Той рядко надхвърля 40%, като останалите белтъци са неалбуминови плазмени протеини с малка молекулна маса (МММ) (b2-M, a1-M, лизозими, леки вериги на имуноглобулините и др.) и тъканни белтъци (Tamm-Horsfall протеини) (118, 141, 158, 226). В нашата група **процентът на албумина** от общия белтък е средно 26,14, с минимална и максимална стойност 6,86% и 68,18%. Екскрецията на албумина с урината е леко, статистически незначимо по-голяма при жените в сравнение с мъжете (13,48 срещу 12,11 mg/l). Поради регистрирани промени за албумина в зависимост от хидратацията и дехидратацията, успоредно проследяваме и показателя **ACR**, което не се влияе от тези промени, показва по-малки вариации и е по-точен показател за албуминурия от различни типове. Нашата средна стойност за ACR е 2,47 с граници от 0,33 до 9,32 (таблица 24) с леко по-високи стойности при жените. Обяснението на този факт е спорно. Може да се търси обяснение и в по-ниската креатининива концентрация при жените и в по-високата албуминова концентрация. На молекулно ниво албуминурията зависи от оксидативния стрес, някои растежни фактори и цитокини, концентрацията на холестерол и триглицериди (69, 104, 226). Концентрацията на албумина в урината корелира правопрпорционално с ACR и възрастта на индивидите. Harvey et al. (73) също съобщават за значително по-ниски коефициенти на вариабилност на отношението албумин към креатинин от екскрецията на албумина (27 срещу 31%, съответно, $p = 0.035$). Това се очаква, тъй като тази корекция за креатинин минимизира влиянието на съдържанието на белтъци в храната и разреждането в урината. Когато концентрацията на албумин е разделена на нивото на креатинина, броят на фалшивите отрицателни пациенти има тенденция към намаляване, факт, който е много важен за скрининг на ХБЗ. Независимо, че KDIGO, NKDEP, NKD и IFCC препоръчват за оценка увреждането на бъбреците на първо място да се използва албуминурията и

ACR, протеинурията не се изключвана при тази диагностика (92, 93, 94, 112-115, 141). Въведена и използвана като маркер в продължение на век и половина, нейното определяне има своята стойност и днес. Нов етап в разбиране на албуминурията и протеинурията е филтърната мембрана (slit diaphragm) и подоцитите. Синтезираният от подоцитите трансмембранен **нефрин** и други протеини (подоцин, актин-4, CD2, WT1, PLCE и други) са основни фактори в изграждането и функционирането на мембраната и гломерулната албуминурия (2, 3, 26, 209, 218, 220). При нашите контроли общият белтък в урината средно е 54,39 mg/l и PCR 10,5. Тези данни са в съгласие други автори (88, 158, 209). **Албуминурията с ACR и протеинурията с PCR са ранен и чувствителен маркер за гломерулна филтрация, тубулна реабсорбция, тубулна секреция и гломерулна хемодинамика.** Дълги години у нас определянето на ОБ в урината беше единственият маркер за увреждане на филтърната мембрана. Албуминурия A2 се използва от скоро, а АСТ и PCR рядко се изследват в нашата страна. За оценка на гломерулната филтрация освен **серумният креатинин**, използвахме турбидиметричния метод PЕTIA за новият биомаркер **цистатин С** в кръвен серум. Аналитичната измерваща граница при нас е от 0,40 до 8,50 mg/l. Тези граници не само покриват промените при болните, но са и под и над тези промени. Cystatin С може да бъде точно измерена чрез този метод, проследим до международния референтен материал, ERM-DA471/IFCC. С този метод средна стойност на **цистатин С при нашите клинично здрави лица е $0,74 \pm 0,11\text{mg/l}$** и граници от 0,50 до 1,02 mg/l. Честотното разпределение на цистатин С общо за мъжете и жените е нормално, Гаусово. Цистатин С в кръвния серум корелира добре с креатинина. Ние също смятаме, че един референтен интервал може да се използва за мъже и жени, поради малката, статистически незначима разлика (21, 38, 57). Finney и сътр. (57-58) при 309 възрастни, контроли установяват референтни граници за серумния цистатин С от 0,58 до 1,02

mg/l. Ognibene и сътр. (148) при 139 здрави, възрастни (78 жени и 61 мъже) намират Гаусово разпределение на серумния цистатин С и стойности от 0,51 до 0,94 mg/l, средно 0,65 за жените и от 0,48 до 0,98 mg/l средно 0,70 за мъжете. Наскоро, 2011 г., Mayo Med Lab (128) с метода РЕТІА предлага общи референтни стойности за възрастни (>18 г.) мъже и жени с граници от 0,488 до 1,134 mg/l. Получихме най-високи резултатите за ГФ в контролите с уравнението само с цистатин ($109,81 \text{ mL/min/1.73 m}^2$), следвани от комбинираната формула ($97,52 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) и това е в съгласие с данните на други автори (18, 59, 69, 114, 127, 185, 211). Според повечето бъбречни фондации референтните стойности на ГФ са 90-120 mL/min/1.73 m² или от 76 до 148 mL/min/1.73 m², без значима разлика между мъже и жени (188, 189). Оценката на ГФ само с креатинин има редица недостатъци поради аналитични и физиологични причини (интерференция на метода, възраст, пол, мускулна маса, диета и други). Получава се както надценяване, така и подценяване на ГФ. При пациенти с увеличена мускулна маса, ГФ е подценена и при намалена мускулна маса ГФ е надценена. При всеки индивид плазмената концентрация на креатинина е плътно разпределена около хомеостатичната контролна точка. При това интраиндивидуалните вариации (CVi) са около 5.3%. Като последица на това, човек може да има увеличена плазмена концентрация на креатинина с влошаване на бъбречната функция и въпреки това ГФ да е в референтната област. Не са редки случаите на повишено ниво на креатинина в серума и нормална ГФ. Някои от тези недостатъци се елиминират с цистатин С, още повече, че последните години е налице международен референтен материал и са разработени подходящи уравнения за оценка на ГФ. Използването на уравнението за определяне на ГФ само с цистатин С е подходящо само при определени условия, в това число и в т.нар. “сляпа“ област на креатинина, при пациенти с наднормено тегло, с диабет и особено при амбулаторни пациенти (18, 77, 107). Въпреки

предимствата на формулата само с цистатин С, тя не може напълно да замени "златен стандарт" за оценка на ГФ, но може да допринесе за точен подбор на пациенти, нуждаещи се от инвазивна и скъпоструващи процедури. Получените стойности за ГФ **само с цистатин С, често са малко по-високи, което се потвърждава и от нашите данни.** Затова се препоръчва използването на комбинираната формула (СКД-EPI) с двата маркера – цистатин С и креатинин (71, 80, 136, 194, 217). Смята се, че това е уравнението на бъдещето за изчисляване на ГФ. Макар и препоръчана, тази формула все още не е намерила широко приложение, поради високата цена и по-голяма трудоемкост. В крайна сметка всички уравнения за ГФ по същество са математически абстракции, които се отнасят до пациенти, от които са придобити уравненията. Невъзможно е едно уравнение да е идеално и подходящо за всички („както един размер не е подходящ за всички“) и клиницистите трябва да знаят и бъдат съпричастни към всички потенциални ограничения при тълкуване на резултати в пълен клиничен контекст. През 2014 г. Tsai и сътр. (211) публикуват данни за средните нива на ГФ определена само с креатинин или само с цистатин С. Разминаването между двете формули при стойности на ГФ < 60 ml в група на диабетиците е 11,8%. Те не посочват предимство на нито един от маркерите. Според тях нито креатинина, нито цистатин С са перфектни филтрационни маркери, защото и двата имат детерминанти не зависящи от гломерулната филтрация. Това още повече налага едновременното им използване (18, 77, 194). Ние намираме значима обратна корелация на ГФ с възрастта на индивидите, цистатин С и с креатинина в серума. Референтните стойности за остаталите показатели, креатинин в серум и урина, липидни показатели, пикочна киселина и други за близо до съобщени от други автори (26, 28, 33, 56-58).

Въоръжени с подходящи методи и при установени референтни стойности решихме да проверим **диагностичната акуратност** на цистатин

С и креатинина за ГФ, албуминурията и ACR, ОБ и PCR за пермеабилитета на филтрационната мембрана и всички останали показатели при болни със заболявания предразполагащи към ХБЗ – **диабет, диабет с хипертония, есенциална хипертония и хронифицирани първични бъбречни заболявания.** ХБЗ е сериозен проблем за общественото здраве във всички страни и у нас. Ето защо оценката на ГФ и албуминурията е от съществено значение за оценката на пациентите с ХБЗ и при високо рисковите групи (3, 46, 54, 125, 163, 164, 187, 208, 214). Определянето на ГФ и албуминурията дава възможност за ранно откриване на увреждане на бъбречната функция и структура и служи за предотвратяване на по-нататъшното влошаване и на появата на усложнения, както и за коригиране на дозата на лекарствата, които се излъчват чрез бъбреците. Laterza и сътр. (109) проучват публикациите за 5-годишен период (от 1997 г. до 2002 г.), свързани с методите за измерване, с референтните интервали и диагностичната точност на цистатин С и креатинина за оценка на ГФ. От 24 публикации в 20 се твърди, че серумните стойности на цистатин С са независими от възрастта и пола. Те проучват чувствителността и специфичността на база ROC-криви. **От 24 проучвания в 15 се твърди, че цистатин С превъзхожда серумния креатинин** при откриване на нарушена ГФ, докато в 9 се твърди, че цистатинът няма предимства и е равностоеен на креатинина в повечето случаи. При висока плазмена концентрация на креатинина тубулната секреция се увеличава и това води до надценяване на ГФ при пациенти с умерено до силно намалена филтрация (<50 ml/min/). Оценката на ГФ доскоро се основаваше само на серумния креатинин и се използваше рутинно. Често ГФ е неточна, което потенциално води до свръхдиагноза или късно откриване на ХБЗ. Поради тази причина Inker и сътр. (80) проверяват алтернативния маркер - цистатин С. Чрез крос-секционен анализ при 5 353 участници от 13 проучвания авторите проверяват цистатин С и креатинин, като

самостоятелни и комбинирани маркери за оценка на ГФ. Анализите са проследими до първоначалните референтни материали. Средно измерената ГФ е 68 и 70 ml/min/1.73 m². При проверка на данните е направена констатация, че **едновременното използване на креатинин-цистатин С-уравнението е по-ефективно** от прилагането на уравнения, които използват самостоятелно креатинин или цистатин С. При участниците, чиято прогнозна ГФ на базата на креатинина е 45-74 ml/min/1.73 m², комбинираното уравнение подобрява класирането на измерената ГФ или като по-малко от 60 ml/min/1.73 m², или като по-голямо от или равно на 60 ml/min/1.73 m² (индекс на прекласификация, 19,4% (p <0,001). Правилно прекласифицирани са 16.9% от пациентите, които са определяни с прогнозна ГФ от 45-59 ml/min/1.73 m², като имащи ГФ от 60 мл или повече за минута. Едновременното използване на креатинин и цистатин С е особено полезно за ХБЗ (54, 136, 158, 165, 167, 176, 210, 224). Серумният креатинин е нечувствителен за откриване на слабо намаляване на ГФ, защото липсва линейна връзка между двата показателя. Затова имат значение и аналитичните условия за определяне на креатинина чрез Jaffe-методите, които се влияят от глюкоза, пикочна киселина, кетони, плазмени протеини и цефалоспорини и други (53). Хората с ХБЗ страдат от ускорена атеросклероза и е по-вероятно да развият сърдечно-съдови заболявания, включително сърдечен пристъп, сърдечна недостатъчност, нарушения на сърдечния ритъм и инсулт. Множество изследвания през последните години сочат, че хората с бъбречно заболяване по-често имат сърдечни заболявания, дори и при леко нарушена бъбречна функция. Честотата на смърт от сърдечно заболяване е средно около 3 пъти по-голяма при хората с бъбречно заболяване, отколкото при хора на същата възраст и от същия пол, но със здрави бъбреци. При напреднала ХБН този риск е над 6 пъти по-висок отколкото при хората с нормална бъбречна функция. От друга страна, бъбречните увреждания са много чести при хора със сърдечни

заболявания и са свързани с повишена смъртност (44, 108, 141, 166, 189). Хора със сърдечно заболяване и намалена бъбречна функция имат с около 50% повишен риск от смърт в сравнение с тези, които имат нормална бъбречна функция. Няколко изследвания са установили, че повишените нива на цистатин С са свързани с инфаркт на миокарда, инсулт, сърдечна недостатъчност, метаболитен синдром и риск от смърт. Цистатин С може също да бъде свързан със смъртността, независимо от бъбречната функция (13, 14, 102, 130). Оптималното откриване и последващата стратификация на риска на хората с ХБЗ изисква освен оценка на ГФ с цистатин С и креатинин и определяне пермеабилитета на гломерулната филтрационна мембрана чрез **албуминурия или протеинурия** (Johnson 2012, 88). В рандомизирани контролни клинични проучвания за доказване на бъбречно увреждане много често се приема за достатъчно само определянето на протеинурията чрез сухи тестове, което е неправилно (Guh 2010, 69). Нашите проучвания, както и почти всички други показват, че уринните протеинови показатели, съгласно диагностичната им ефективност, се подреждат в следната последователност: **ACR, екскреция на албумин, PCR и накрая ОБ**. Според NKF от 2013 г. класифицирането на ХБЗ задължително изисква определянето на ГФ и на албуминурията и ACR. Когато бъбречната функция се оценява чрез ГФ, а степента на увреждане на бъбреците - чрез албуминурията, се подобрява прогнозирането на риска за бъдещето ХБН и последващи сърдечно-съдови инциденти. Диагнозата на ХБЗ закъснява, главно поради липса на определени клинични симптоми. Почти винаги се пропуска степен I и II, но не рядко и степен IIIа на ХБЗ. Това налага ранно използване на биомаркерите за откриване и третиране на ХБЗ, за елиминиране или забавяне на терминалната бъбречна недостатъчност, сърдечно-съдовите усложнения и смъртността. Затова проследихме широко дискутираните **нови биомаркери за нашата страна**, както и някои често използвани, основни показатели. Преди всичко

искахме да проследим тези биомаркерите при **диабет тип 2** с и без регистрирана хипертония. Броят на болните от диабет се увеличава и у нас, поради застаряването на населението, урбанизацията, нарастващия брой на случаите на затлъстяване и липсата на физическа активност. Според СЗО разпространението на диабет за всички възрастови групи по света се оценява от 2,8% през 2000 г. на 4,4% през 2030 г. (70, 194). Към 2010 година броят на болните от захарен диабет в България се оценява на около 520 хиляди души или 8,3% от населението над двадесетгодишна възраст, като 200 хиляди от случаите не са диагностицирани. За да се предотврати това увеличение, скринингът за ХБЗ и ранната интервенция са особено необходими. При пациенти с диабет ранното откриване на **диабетна нефропатия** се фокусира върху оценката на албуминурията и АСР. При 152 диабетици без регистрирана хипертония с възраст близка до тази на контролите, установихме, че теглото и ВМІ са значимо по-високи при диабетичите в сравнение с контролите. **В литературата** не установихме **разделяне на диабетичите без и с хипертония**. Добре известно е, че диабетна нефропатия е едно от най-значимите дългосрочни усложнения на диабета. Тя е причина за бъбречна недостатъчност и за повече от половината от всички случаи на ТБН. Среща се между 20-40% от диабетичите в продължение на живота им и е основната причина за смъртта им. Развитието на ДН може да бъде предотвратено или забавено, стига да бъдат навреме използвани съответните биомаркери (9, 29, 45, 131). Следователно, ранното диагностициране на ДН е критично. Традиционно у нас дълги години ДН се диагностицираше с установяването на протеинурия. Последните две десетилетия началната нефропатия се определя от появата на микроалбуминурия. Появата на албуминурия А2 и особено нейното задържане за повече от 1-3 месеца е маркер за ранна ДН. Доказването ѝ е много важно поради факта, че тя отразява общата ендотелна дисфункция на бъбреци, миокард и съдова стена. Нашата група

на диабетици е с давност на заболяването от 2 до 20 г., което ни позволява да търсим връзка с появата на албуминурията и продължителността на диабета. Основните **протеинови показатели** за увреждане на бъбреците са статистически значимо увеличени при нашите болни. Това увеличение при диабетите без хипертония е както следва: АСР 6,1 пъти, албумин в урината 4,0 пъти, РСР 3,4 пъти и ОБ 2,2 пъти (таблица 31). Гломерулният произход на тези увеличения се потвърждава и от по-високият процент на албумина от общия белтък 43,70% срещу 26,14% при клинично здравите лица (таблици 31 и 24). Съгласно маркера АСР с неизявена ДН са 71 (46,7% от диабетите, а спрямо албуминурията са 77 от нашите диабетици или 51,3%. При всички тях регистрираме албуминурия А1. Тези болни са по-млади спрямо болните с албуминурия А2 (средно 52,7 г. към 57 г.), с по-малка давност на диабета (средно 6,04 г. към 8,9 г.) и по-ниска концентрация на гликирания хемоглобин (6,63% към 7,71%) (таблица 37). От диабетите с албуминурия А2 (микроалбуминурия) са 67 болни или 44,66% и само 6 болни са с албуминурия А3 или 4%. **Доказваме албуминурия А2 доста рано**, при болни 5 години след установяването на диабета. Обръщаме внимание на този факт, защото има мнение, че микроалбуминурията трябва да се проследява при диабет тип 2, 10 години след началото на заболяването. Нашите болни с албуминурия А3 (макроалбуминурия) са в стадий на изявена диабетна нефропатия (Шб стадий). **Установихме албуминурия А2 още в първи и втори стадий на ХБЗ.** Намираме положителна корелация между албуминурията и концентрацията на HbA1c ($r=0,581$), с цистатин С ($r=0,243$) и давност на заболяването ($r=0,219$) (таблица 35). Още по-манифестни са промените при показателя АСР с още по-висока корелация. Една част от нашите диабетици, предимно с малка давност на заболяването, показват албуминурия А2 (26,9%) без наличие на протеинурия и увеличение на РСР. От друга страна ние нямаме диабетици с увеличен общ белтък и

нормален албумин в урината. Това е в подкрепа на становището и на други автори за **по-високата чувствителност на албуминурията и ACR от протеинурията и PCR** (70, 88, 127, 203). По-високият процент на диабетиците с албуминурия A1, нормално ACR, нормален общ белтък и PCR се отчита и на фигурите с честотното разпределение на тези показатели (фигура 18). От фигурата ясно личи, че има известно изместване на хистограмата към лявата страна, към горния край на референтните стойности. Албуминурията и протеинурията са маркери за увреждане на гломерулите, но след това те самите стават причина за по-нататъшно увреждане на бъбреците, защото водят до възпаление, гломерулосклероза и загуба на площта за филтриране (9, 45, 66, 69). Албуминурия A2, която прогресира до албуминурия A3 е рисков фактор за развитие на ТБН. При албуминурия A3, албуминът става доминиращ белтък. При нашите 6 болни с албуминурия A3, процентът на албумина е от 42 до 74% от общият белтък, по-висок от тези с албуминурия A2. Протеинурията говори за присъствие на излишък от плазмени белтъци в урината, които преминават филтърната мембрана или не могат да бъдат реабсорбирани. Подоцитите, тези основни клетки в структурата и функцията на гломерулната филтрационна мембрана (slit diaphragm), намаляват при ДН. Фактори, които спомагат за развитието на ДН са хипергликемията, поради гликиране на белтъци (особено на албумин според по-нови данни) и намалената инсулинова сигнализация, поради намалена секреция на инсулин или инсулинова резистентност и други (88, 226). Рискът от увреждане на бъбреците се увеличава със степента на албуминурията, респ. протеинурията. **В подкрепа на диагностичната акуратност на протеиновите показатели – албумин, ACR, общ белтък, PCR и процент на албумина от ОБ са ROC кривите** (фигура 19). Както е демонстрирано от фигурите, площта под кривата е най-голяма за албумин в урината (0,895, $p < 0,001$) следвана от ACR (0,888, $p < 0,001$) и PCR (0,811,

$p < 0,001$). Диагностичната акуратност се регистрира и от високата чувствителност, специфичност и прецизност на тези протеинови параметри (таблица 36). По-голямата акуратност на ACR и по-малката му зависимост от странични фактори (напр. хидратация, дехидратация, циркадни ритми, вегетарианска диета и др.) оправдават предпочитането му пред определяне на албумина в урината. Поради по-честото и лесно изследване на ОБ, проследяването на протеинурията и PCR също намериха място при нашите болни, но предимството на ACR според нас си остава.

Проучихме и друга група от **162** диабетици, които са с **регистрирана хипертония**. Това са болни, които започват с диабет тип 2 и след определено време имат регистрирана хипертония. В литературата при разглеждане на ДН се говори, че болните имат и хипертония, с честота стигаща до 60-80%. Възрастта при тези наши болни е малко по-голяма от тази на диабетици без хипертония (средна стойност 58,54 г. спрямо 55,12 г.). Отново при вариационният анализ се демонстрират промени спрямо контролната група на всички изследвани показатели (таблица 49). Протеиновите показатели албумин и ОБ в урината, ACR и PCR са статистически значимо увеличени спрямо контролната група. Стойностите на **ACR и PCR са по-високи не само спрямо контролите, но и спрямо диабетите без хипертония**. Ние приемаме, че **появата на хипертония при диабет тип 2 е допълнителен отежняващ фактор** за развитието на ДН, респ. ХБЗ. В потвърждение на това е и честотното им разпределение, което е леко изместено в дясно, към по-високите стойности, не само спрямо контролите, но и спрямо диабетите без хипертония. Макар и статистически незначимо, албуминът и ОБ в урината при диабетите с хипертония са по-високи при мъжете в сравнение с жените (таблица 50). Албуминът в урината показва висока, правопрпорционална корелация с давността на заболяването ($r=0,733$, $p < 0,001$), с цистатин С ($r=0,514$, $p < 0,001$), с креатинина в серума ($r=0,232$, $p < 0,01$) и с общия холестерол

($r=0,258$, $p<0,01$). Подобна тенденция се наблюдава и за ОБ в урината. Представените ROC криви на фигура 23 определено подкрепят твърдението ни за диагностичната акуратност на протеиновите показатели, започвайки от ACR, при което площ под кривата е 1, $p<0,001$ следва PCR с площ под кривата 0,977, $p<0,001$ и албумин в урината с площ под кривата е 0,915, $p<0,001$. Показателите **чувствителност, специфичност, прецизност и предиктивна стойност са също по-високи спрямо групата на диабетиците без хипертония**, за което според нас допринася повишеното кръвно налягане. Промените в **липидните показатели** са много демонстративни, подкрепени и от техните ROC криви и също са по-силно изразени в сравнение с болните с диабет без хипертония. С албуминурия A1 са 77 болни, 47,5% и с албуминурия A2 са 85 болни, 52,5%. С албуминурия A2 са по-възрастните болни и с по-голяма давност на заболяването. В тази група нямаме болни с албуминурия A3. Тези наши данни ни дават основание да считаме, че появата на хипертония след диабета, води до още по-изразено засягане на бъбреците, преценено чрез белтъчните показатели. Следващата ни задача бе да проверим влиянието на **първичната (есенциалната) хипертония върху бъбречната функция**. Известно е, че хипертонията е другият важен фактор за ХБЗ, заедно с диабета. Освен в световен мащаб, хипертония се увеличава и у нас. У нас относителният дял на хипертониците е трайно висок – 21,3%. Хипертонията е най-разпространеното хронично заболяване, което засяга 18.3% от мъжете и 24.4% от жените. В момента има над 1 800 000 хипертоници и всяка година броят им се увеличава с по 9000 души. Заболяването поражда предимно лицата от възрастовата група 45-64 г. Епидемиологичните проучвания показват, че половината от българите над 50-годишна възраст са с високо кръвно налягане. Точната причина за хипертонията е трудно да се предскаже, защото хипертония е резултат от сложно взаимодействие на генетични и факторите на околната среда (157).

Микроалбминурия в есенциална хипертония е независим рисков фактор за сърдечно-съдови и мозъчно-съдови заболявания. Освен това, албминурия А2 (микроалбминурия) е описана, като ранен признак за увреждане на бъбреците с прогресия до терминална бъбречна недостатъчност. Тя увеличава риска за развитие на мозъчни, сърдечни и бъбречни увреждания. С участието главно на **хипертонията се обяснява високата честота на мозъчните инсулти и сърдечните инфаркти у нас.** У нас изследването на албуминовата екскреция и АСР не са рутинно изследване при хипертониците. По-голямата част от пациентите, около 95% с високо кръвно налягане имат есенциална хипертония. Останалите, около 5% са със симптоматична хипертония поради друго системно заболяване. Много важни фактори за първичната хипертония са възраст и обезитас. Макар да има спор, надделява мнението, че хипертонията е причина за развитието на ХБЗ, поради развиващата се хипертензивна нефросклероза. След това самото увреждане на бъбреците води до влошаване на хипертонията. Високото кръвно налягане екцербира АУ и ПУ и улеснява развитието на тубулоинтратициално възпаление, фиброза, тубулна атрофия и като резултат още повече увеличава кръвното налягане (76, 88, 156, 157). По литературни данни албминурия А2 се наблюдава от 30 до 40-50% от болните с есенциална хипертония (76, 107, 157, 199). Микроалбминурията при тези болни корелира с някои други сърдечно-съдови рискови фактори. Има данни, че оптималният контрол на кръвното налягане, особено на систолното налягане води до намаление на албумина в урината. ACE инхибитори и ARB забавят развитието на ХБЗ и намаляват албминурията. Доста автори, включително и NKF и KDOQI препоръчват определянето на албумина в урината и АСР, като маркери за бъбречна дисфункция при хипертония (92, 94, 114, 141, 145). Нефропатията при хипертония се свързва с промени в интратенална хемодинамика и генерализирана системна ендотелна дисфункция. Връзката между

бъбречните и сърдечно-съдови патологии при напреднала бъбречна и сърдечна болест е добре характеризирани. Въпреки това, в началото на болестта, тези асоциации не са по-ясно дефинирани. Освен че е ранен признак на увреждане на бъбреците, микроалбуминурия е маркер за възпалителен процес. В нашата група на **есенциална хипертония са включени 150 болни** (65 мъже и 85 жени), без диабет или други причини водещи до албуминурия А2 или А3. Средната възраст, тегло и ВМІ на хипертониците са значимо ($p < 0,05$) по-високи в сравнение с клинично здравите лица (таблица 39). Болните са с давност на хипертонията от 1 г. (2 болни) до 22 г. (1 болен) с интервал от по 1 година, като най-много са болните с давност на хипертонията 3 г. (24 болни, 16%). С диастолично налягане > 81 mm Hg по време на изследването са 87 болни или 58% и със систолично налягане > 140 mm Hg са 50 болни или 33%. Средната стойност на албуминурията и АСR са 2,4 и 3,5 пъти по-високи от контролните стойности (таблица 40). Заслужава да се отбележи, че в нашата група с албуминурия А1 са 89 болни или 60,1% и с албуминурия **А2 59 болни или 39,9%**. При нито един хипертоник не сме регистрирали албуминурия А3. За разлика от контролите и двата показателя албуминурия А2 и АСR са по-високи при мъжете в сравнение с жените, което се съобщава и от други автори (76, 87, 107). Нашите мъже са с по-висок ВМІ, с намален HDL-C, увеличен LDL-C и с по-високо систолично и диастолично кръвно налягане спрямо жените. Това несъмнено има значение за по-изразената албуминурия. Налице е връзка между тютюнопушенето, консумацията на алкохол и микроалбуминурия. Статистически значимо е увеличението на серумния цистатин С в групата на хипертониците. Не е известно дали този протеин може да бъде свързан със сърдечните усложнения, което се срещат често при пациенти с есенциална хипертония. Албуминурията и АСR корелират правопрпорционално с тежестта и продължителността на хипертонията, особено с диастоличното кръвно налягане ($p < 0,001$). По-

голямата възраст, по-високият общ холестерол ($p < 0.01$) и по-високия ВМІ ($p < 0.05$) са другите идентифицирани рискови фактори за албуминурия А2 при нашите болни. Болните с хипертония и албуминурия А2 имат големи шансове за развитие на ХБЗ, ССЗ, ретинопатия и други. Според литературните данни албуминурия А2 се среща с честота от 20-40-50% при хипертониците и албуминурия А3 от 3 до 20%. В неконтролирана хипертония честотата стига до 60-70% (76, 107, 157). Nitha и сътр. (76) регистрират албуминурия при 26,67% от 130 хипертоници, с по-високи стойности при мъжете и при по-възрастните. Poudel и сътр. (157) проследяват 106 болни (60 мъже и 46 жени) с есенциална хипертония и намират микроалбуминурия при 51,88% с по-голяма честота при жените (58,7%). Честотното разпределение на албумина в урината, АСR и РСR при нашите пациенти е изместено в ляво показващо, че повече от половината от хипертониците са със стойности в горната част на референтната област. Корелацията на албумина е изразена по сила с давността на хипертонията ($r=0,488$, $p < 0,001$) и с АСR ($r=0,640$, $p < 0,001$). Корелацията с цистатин С и креатинина в серума е много близка ($r=0,387$, $p < 0,001$ и $r=0,366$, $p < 0,001$). При хипертониците корелацията с триглицеридите е по-висока ($r=0,256$, $p < 0,01$), отколкото с общия холестерол ($r=0,205$, $p < 0,05$). Акуратността на диагностичната стойност на белтъчните показатели се потвърждава и от представените **ROC криви** (фигура 21). Площта под кривата е 0,884 за албумина, 0,797 за АСR и 0,750 за РСR. Диагностичната чувствителност на албумина е 93%, при специфичност 56% и прецизност 74% и за АСR съответно 81%, 53% и 67%. Близки до тези проценти са и данните за РСR и ОБ (таблица 44). Днес се разчита на албуминурията, като маркер за увреждане на бъбреците при пациенти с есенциална хипертония. Въпреки това, истинската микроалбуминурия при пациенти с хипертония все още не е определена и се очаква да е доста висока, особено при лош контрол на артериалното налягане. Доказано е, че микроалбуминурията е маркер на

системната ендотелна дисфункция, счита се за ранен етап на атеросклеротичния процес. Годишен скрининг за албуминурия А2 е нужен и у нас, защото е прост, евтин, лесен за изпълнение и се препоръчва от европейските асоциации по хипертония. Пациенти с микроалбуминурия трябва да се лекуват по-агресивно с антихипертензивни средства, които осигуряват пълна RAS блокада за да се намали риска от ССЗ. Трайно намаляване на албуминурията А2 е нужно за дългосрочна превенция от ССЗ и може да осигури така необходимите намаления в общите разходи за здравеопазване. Нашите и литературните данни показват, че албуминурията при хипертония е по-честа при мъжете и то при тези, при които е налице намален HDL-C, увеличен LDL-C и които имат по-високо кръвно налягане, както и по-висок ВМІ. Тя е свързана и с присъствието на таргетна органна увреда, променена ECG, съдови промени в ретината и други. Тя корелира с тежестта и продължителността на хипертонията. Албуминурията е независим рисков фактор за сърдечносъдови и мозъчносъдови промени, като исхемично сърдечно заболяване и инсулт, както и за всички причини за смърт.

Следващата ни група е тази на **52 болни, 23 жени и 29 мъже. Това са болни с леко хронично бъбречно заболяване в резултат на гломерулонефрит, пиелонефрит и калкулоза.** Почти всички форми на остър гломерулонефрит имат тенденция да прогресира до хроничен гломерулонефрит. Състоянието се характеризира с необратимо и прогресивно гломерулна и тубулоинтерстициална фиброза, в крайна сметка води до намаляване на скоростта на ГФ и задържането на уремични токсини. Ако прогресия на заболяването не се спира с терапия, резултатът е хронично бъбречно заболяване, прогресиращо до ТБН и ССЗ. НКФ определя ХБЗ след гломерулонефрит въз основа на албуминурия, протеинурия и/или хематурия и намаление на ГФ. Ние проследихме същите показатели, както при останалите групи. Спрямо контролите

болните са с по-голяма възраст, тегло и ВМІ. Резултатите от изследваните показатели са представени на таблици 56 и 57. Спрямо контролите всички изследвани показатели са статистически значимо променени при $p < 0,001$. **Белтъчните показатели (албумин и ОБ в урината, АСР и РСР), цистатин С и креатинин в серума са най-силно увеличени в тази група.** Това се вижда и от честотното разпределение на същите показатели с не Гаусово разпределение и със значителна по-широка крива, която е с изместен център към дясно (фигура 24). Корелационните зависимости на албумина в урината са високи и правопрпорционални с АСР ($r=0,822$, $p < 0,001$), РСР ($r=0,724$, $p < 0,001$) и давността на заболяването ($r=0,650$, $p < 0,001$). Още по-силни са тези зависимости с ОБ в урината (таблица 58). За определяне на праговите стойности на количествените променливи използвахме ROC анализ. Представените **ROC криви** (фигура 25) разкриват много добрата диагностична акуратност на белтъчните показатели с площ под кривата над 0,900 при $p < 0,001$ за 4-те показатели (албумин и ОБ в урината, АСР и РСР) Чувствителността, специфичността и прецизността са много големи с водещ показател албумин в урината (94%, 92% и 93%). Близки до тях са и резултатите за ОБ в урината, АСР и РСР (таблица 60). В тази група са най-малко болните с албуминурия А1, 18 болни, 35%. Останалите болни са с албуминурия А2, 34 пациенти или 65%. Корелационният коефициент на цистатин С с креатинина в серума е най-висок при тези болни ($r=0,420$, $p < 0,01$).

ГФ е друг много важен параметър за оценка на бъбречната функция, който проучихме. ГФ се установява с екзогенни или ендогенни маркери. И едните и другите имат предимства и недостатъци. По света като „златен“ стандарт за ГФ се приема екзогенният маркер, инулин (133, 153, 198). Точното определяне на ГФ изисква използването на инвазивни, базирани на инжектирани екзогенни вещества, такива като инулин, 125 йоталамат, йохексол, 51Cr-EDTA или 99mTc-DTPA. Тези процедури са

трудоемки, скъпи и не съвсем без потенциал за вреда. Използването на екзогени маркери е ограничено, особено в рутинната практика, както по света така и у нас, поради по-високата цена и по-сложната техника, както и поради инвазивност, необходимостта от събиране на урина и други. През годините много ендогенни кръвни съставки са използвани за изчисляване на ГФ – урея, пикочна киселина, креатинин и други. Най-често и най-продължително време се използва креатинина, а напоследък и цистатин С (9, 13, 18, 25, 34, 48). **Затова ние избрахме да определяме ГФ с ендогенни маркери и то с креатинин и цистатин С.** Цистатин С се получава при постоянна скорост от ядрени клетки и се освобождава в кръвта с полуживот на 2 часа. Неговата концентрация е почти изцяло зависима от ГФ (85, 166). Досега в нашата страна не е използван цистатин С за изчисляване на ГФ. Последната е отлична мярка за капацитета на филтърната мембрана. Нивото на ГФ е силен предиктор на времето за поява на бъбречна недостатъчност. Директното определяне на ГФ е много трудно. По-скоро, ГФ се изчислява въз основа на различни уравнения включващи един или два ендогенни маркери. През последните години се създава една референтна стойност, съобразена с възраст, пол, тегло и раса. Доскоро ГФ се оценяваше чрез уравнения, в които основен фактор е креатинина. Концентрацията на креатинин в кръвта обаче се влияе от различни фактори в това число от мускулна маса, възрастта, диета, пола и разлики в степента на бъбречна, респ. тубуларна секреция (33, 56, 57). При здрави индивиди се установява, че креатининовият клирънс редовно надвишава инулиновият клирънс от 10 до 40%. В допълнение, връзката между креатинин и ГФ е надеждна само за пациенти в стабилно метаболитно състояние. С други думи, ГФ оценена с креатинина е по-малко полезна при бременни жени, хоспитализирани пациенти, както и при пациенти с остри или продължителни заболявания. Освен това, всяко състояние, което засяга мускулна маса или мускулния метаболизъм ще

намали надеждността с креатинина да се оцени бъбречната функция. Например, пациенти в напреднала възраст с крехко здраве, критично болни, страдащи от затлъстяване и рак ще бъдат засегнати, както и хора, които са имали ампутация или са неподвижни, или участват в усилените тренировки или културизъм. Креатининът също е по-малко полезен биомаркер при индивиди на вегетариански диети или тези, които вземат креатинин, като добавки. Има повишение на креатинина след обилна консумация на месо. Накрая, креатининът слабо корелира с ГФ в състояния, свързани с повишена тубулна секреция или извън бъбречно елиминиране, както е при тежки ХБЗ (18, 22, 33, 133, 151). Въпреки всичко това до януари 2012 г. въз основа на ГФ изчислена само с креатинин, ХБЗ се класифицираха в пет стадий (1, 2, 3, 4 и 5). Праг за диагностика на ХБН се приемаше $\text{ГФ} < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. ГФ е от съществено значение за откриване, управление и оценка на ХБН (1, 6, 25, 26, 36, 39, 40, 52). Един от биомаркерите намерил най-широко приложение в продължение почти на век по целия свят е креатининът. У нас креатининът продължава да е почти единственият ендогенен маркер за оценка на ГФ. Синтезата му е относително постоянна и зависи от мускулната маса, пола, възрастта и други (156, 167, 221). При здрави, той се филтрира свободно и слабо се реабсорбира от проксималните тубули. При хиперкреатининемия обаче, ГФ намалява с 50-60% и тубулната реабсорбция се увеличава. Този маркер е много добре познат и е с ниска себестойност. През годините са регистрирани и доста негови недостатъци, като екстраренално елиминиране, компенсаторна хиперсекреция (т.нар. сляп креатининов кръг), силна зависимост от аналитични и физиологични фактори и други (27, 37, 90, 113). Това е причина за търсене на други ендогенни биомаркери за оценка на ГФ. Един от тях е цистатин С с все още недоуточнено клинично значение (20, 25, 34, 77, 175, 178). Описан е за първи път през 1961 като "gamma trace" заедно с друг протеин. Той е 13,3 kD белтък,

кодиран от CST3 гена. При хората, всички ядроносни клетки го синтезират и затова се намира в почти всички тъкани и телесни течности. Не се свързва с плазмените белтъци и след свободно преминаване през гломерулите не влиза повторно в кръвообращението, а се реабсорбира и метаболизира в тубулите (25, 34, 63, 112, 113). Още през 1985 г Simonsen и сътр. (184) го предлагат, като показател за ГФ, но клиничното му приложение е едва от последните десетина години. При сравнение с креатининът, доста автори изтъкват предимствата на цистатин С, като постоянен синтез, свободна филтрация, липса на екскреция с урината, метаболизъм в проксималните тубули, независимост от циркадни ритми и мускулна маса, няма извънбъбречен клирънс, позитивиране при минимални бъбречни увреждания и отчетливи промени в негативната креатининова област (19, 66, 106, 122, 124). Проведените два големи мета анализи заключават, че цистатин С превъзхожда креатинина при изчисляване на ГФ (48, 166). В началото ентузиазъмът е толкова голям, че някои автори **обявяват цистатин С за „идеален“ маркер за ГФ.** Натрупаните данни не оспорват известни предимствата на цистатин С пред креатинина, но демонстрират зависимостта му от стероиди, възпалителни процеси, хипо- и хипертиреоидни състояния и някои телесни съставки. Има положителна корелация между цистатин С и възпалителни параметри, включително интерлевкин-6, резистин, тумор-некротичен фактор и CRP, както и данни за влияние на небъбречни фактори (43, 60, 98). Спорът дали цистатин С трябва да измести креатининът или двата маркери се допълват продължава (98, 113, 77, 107, 133, 136, 178). **Нашето проучване се включва в хипотезата за проверка ролята на цистатин С, самостоятелно или в комбинация с креатинина при болни с ХБЗ следствие на диабет, хипертония и ХПБЗ.** ГФ изчисляваме по четири уравнения включващи само креатинин, само цистатин С и комбинация от двата фактора за да установим предимствата и недостатъците им. Тези

формули са одобрени и препоръчани от NKF и KDIGO през 2009-2013 г. (92, 94, 145, 164). Предимството на тези формули е, че те включват концентрацията на серумния креатинин и/или цистатин, съобразени с пола, възрастта и етническата принадлежност. При нас макар и близки, резултатите за ГФ установени с отделните формули показват известни разлики и тенденции. **Средните стойности на ГФ в контролната група с различните формули са от 76,24 (с MDRD) до 109,81 mL/min/m² (само с цистатин С) (таблица 24).** Ние смятаме за най-приемливи стойностите получени с комбинираното уравнение (97,51 mL/min/m²). Това са стойности за възрастни и са близки до съобщените литературни данни от Вевс и сътр. (18) през 2012 г. и Тео и сътр. (205) също 2012 г. Те също използват четирите формули за ГФ, както и ние. Двете групи автори заключават, че комбинираното уравнение с цистатин С и креатинин дава най-точна и вярна оценка на ГФ в целия диапазон на ГФ и в подгрупите въз основа на дермогафски и клинични характеристики. Преди тях, Stevens и сътр. (194) проверяват при 3418 индивида ГФ само с цистатин и с комбинираната формула и заключават, че последната дава много точна оценка, съобразена с възраст, пол и раса. Те заключават, че СКД-ЕPI формулата с креатинин е по-добра от MDRD, както и че формулата само с цистатин С дава малко по-високи стойности. Ние установихме **лека полова разлика** в стойностите за ГФ само с формулата с цистатин С, с по-високи стойности за мъжете, а с останалите формули тази разлика е незначима. **В групата на диабетиците** без регистрирана хипертония, средните стойности на ГФ с различните формули са статистически значимо по-ниски от тези при клинично здрави лица (таблица 31), най-добре изразени с комбинираната формула. Честотното разпределение на стойностите на ГФ е Гаусово при участието само на креатинина и ненормално при участието на цистатин С. **Представените ROC криви (фигура 19)** допълват данните от протеиновите показатели за по-голямата

диагностична значимост на ГФ оценена с участието на цистатин С в сравнение с креатинина (площ под кривата 0,846, $p < 0,001$ към 0,526, $p = 0,426$). При съответната прагова величина, процентът на чувствителността, специфичността, прецизността и предиктивните стойности са най-високи с уравнението само с цистатин С, но най-съответни и приемливи с комбинираната формула (табл. 36), сравнявайки ги и с другите показатели. Корелационните коефициенти показват най-силна зависимост на ГФ от давността на заболяването ($r = -0,719$ до $0,716$, $p < 0,001$ (таблица 38) и възрастта на болните ($r = -0,613$ до $0,601$, $p < 0,001$). Установяваме и умерена по сила обратна корелация с албуминурията, значително по-добра с цистатин С ($r = -0,471$, $p < 0,001$) спрямо креатинина ($r = -0,120$, $p < 0,05$). **С намалена ГФ $< 60 \text{ mL/min/m}^2$ са 32 диабетика или 21,1%.** Най-голяма е групата на болните попадащи във II-и стадий на ХБЗ (72 болни, 47,4%), следвани от IIIа стадий (28 болни, 18,4%).

Намалението на ГФ в групата на **диабетици с хипертония** също е статистически значимо спрямо контролите ($p < 0,05$) най-силно при комбинираното уравнение (83,53 спрямо $97,52 \text{ mL/min/1.73 m}^2$). Намалението на средните стойности на ГФ при тези болни спрямо контролната група е от 16% до 29% в зависимост от използваната формула. Това се потвърждава и от честотното разпределение на ГФ (фиг. 22), което е Гаусово, разположено на широка основа с център леко изместен в ляво. И в тази група диагностичната акуратност според ROC кривите е по-точна при формули с участието на цистатина спрямо креатинина (сравнете площта под кривата ($0,710$, $p < 0,001$ към $0,509$, $p = 0,772$). Спрямо избраната прагова величина, чувствителността, специфичността и прецизността е най-добра при оценка на ГФ с комбинираната формула (табл. 53). ГФ демонстрира умерена до висока обратна корелационна зависимост с възрастта, протеиновите и липидни показатели, глюкоза и HbA1c (табл. 55). С намалена ГФ $< 60 \text{ mL/min/m}^2$ са 21 болни или 13%. Най-голяма е

групата на болните попадащи във II-и стадий на ХБЗ (78 болни или 48,1%), следвани от IIIа стадий (12 болни или 23,1%). Добре известно е, че ГФ намалява с напредването на възрастта при хора без диабет (с около 0,75 мл/мин/година), и този процес се ускорява при диабет, ССЗ и затлъстяване. С напредването на диабета допълнително спадът в бъбречната функция е най-вече свързан с продължителността и тежестта на хипергликемия, и гликираните белтъци. Намалената ГФ предоставя допълнителен риск за развитие на ССЗ. **Съчетанието на албуминурия с намалена ГФ още повече засилва риска от ССЗ.** Добрият гликемичен контрол отлага появата и забавя прогресията на бъбречното заболяване. Албуминурията е съществен фактор за намаление на ГФ, но освен това други фактори също допринасят за това, като хипертония. Kim и сътр. 2013 (96) установяват при 237 диабетици силна корелация на серумния цистатин С и белтъчните показатели в урината с ГФ и това предсказва ДН. Има литературни данни, че при диабетици с тип 2, чрез цистатин С е предсказано развитието на ХБН в 72%, а чрез креатинина в 62% (103).

В групата ни на болни с есенциална хипертония промените в ГФ са незначими, почти без разлика между използваните формули (табл. 40). Честотното разпределение е нормално, много леко изтеглено към лявата част, към референтната област (фигура 20). ROC кривите (фигура 21) показват много по-малка площ под кривата за ГФ определена с участието на креатинина спрямо тази с цистатин С (0,522 към 0,710). Корелационните коефициенти (таблица 46) на ГФ са отрицателни, изразени по сила и умерени спрямо давността на хипертонията, протеиновите и липидните показатели. От използваните четири формули, най-надежни са резултатите по отношение на чувствителност, специфичност и прецизност с цистатин С (таблица 44) и комбинираната формула. **С намалена ГФ <60 mL/min/m² са 11 болни, 7,3%** Най-голяма е групата на болните попадащи във II-и стадий на ХБЗ (84 болни, 56,4%).

Има литературни данни, че серумният цистатин С е свързан с честотата на хипертонията в общата популация, независимо от ХБЗ. Той се приема за по-чувствителен от креатинина за началото на бъбречна дисфункция, свързана с хипертонията. Не се изключва участието и на други извънбъбречни механизми (76, 107, 157).

В групата на болни с ХПБЗ (хронични, първични бъбречни заболявания) се включват пациенти с гломерулонефрит, пиелонефрит и калкулоза) при които процесът е хронифициран. Известно е, че почти всички форми на остър гломерулонефрит имат тенденция да прогресират до хроничен гломерулонефрит. Състоянието се характеризира с необратима и прогресивна гломерулна и тубулоинтерстициален фиброза, която в крайна сметка води до намаляване на скоростта на ГФ и задържането на уремични токсини. Ако развитието на болестта не се спира с терапия, чистите резултати са ХБЗ, ТБН и ССЗ. Болните с пиелонефрит и калкулоза имат същите бъбречни проблеми, както и тези с гломерулонефрит (16, 40, 93, 125, 131, 141, 208). Затова включихме и тази група болни. Проведените изследвания показват промени на всички показатели (таблица 57) спрямо контролите. ГФ е статистически значимо намалена ($p < 0,05$), независимо от използваната формула. Намалението спрямо контролите на средната стойност е от 34,7% с формулата MDRD до 66,5% само с цистатин С. Честотното разпределение на ГФ е Гаусово, независимо от използваното уравнение ($p = 0,200$) с максимум в центъра и на по-широка основа с креатинина, отколкото с цистатин С (фиг. 24). В тази група ГФ показва обратна висока корелация с възрастта на болните ($r = -0.522$, $p < 0.001$), давността на заболяването ($r = -0.849$, $p < 0.001$), ACR ($r = -0.426$, $p < 0.001$), PCR ($r = -0.395$, $p < 0.001$) (табл. 59), най-висока с комбинираното уравнение.

Представените ROC криви (фиг. 25) категорично потвърждават по-добрата диагностична акуратност за ГФ, оценена чрез формулите с

участието на цистатин С в сравнение само с креатинина (вижте площта под кривата). Същото се потвърждава и от данните на таблица 60 за чувствителност, специфичност и прецизност. Според ГФ изчислена с комбинираната формула, болните с ХПБЗ се разпределят, както следва: ГФ $>90 \text{ mL/min/m}^2$, 7 болни 13,5%, от 60 до 89 са 27 болни, 51,9%, от 45 до 59 са 12 болни, 23,1%, от 30 до 44 са 5 болни, 9,6% и само 1 болен е с ГФ $28,0 \text{ mL/min/m}^2$. С намалена ГФ $<60 \text{ mL/min/m}^2$ са 18 болни, 34,6%. Най-голяма е групата на болните попадащи във II-и стадий на ХБЗ (27 болни, 51,9%). Корелацията на серумния цистатин С с креатинина е най-силна при болните с ХПБЗ ($r=0,420$, $p<0,001$), последвана от групата на диабетиците с хипертония ($r=0,328$, $p<0,001$). Разгледани по-групи, ГФ е най-ниска при болните с ХПБЗ, независимо от използваните уравнения (таблица 63), следвана от тези с диабет. Най-леко е намалена ГФ при хипертониците.

Ние установихме и чрез анализ на ROC кривите, че цистатин С превъзхожда креатинина за откриване на намалена ГФ. В известна степен изборът на формула за ГФ зависи и от диагностична стратегия. Ако целта е да се избере оптимална прогноза за GFR или за скрининг или специфична клинична индикация, трябва да се използва комбинираната формула с креатинин и цистатин С. Тази стратегия се използва широко в Швеция (178-182). Оценката на ГФ на база цистатин С се използва, ако ГФ определена по отделно с креатинин и цистатин се различава с $> 40\%$. Подходът в Швеция е да се сравни креатининът с цистатин С и ако разликата е в рамките на 40% една от друга, то средната им стойност е най-добрата оценка. Ако разликата е $> 40\%$, клиницистите трябва да избират оценка въз основа на клиничната характеристика. През 2012 г. Тео и сътр. (195) определят валидността на самостоятелните (само с креатинин или само с цистатин С) и комбинираните (едновременно с цистатин С + креатинин) формули за оценка на ГФ при 232 болни с ХБЗ. Те установяват, че **комбинираното уравнение дава най-точна и верна оценка на ГФ в**

целия диапазон на ГФ. Чрез тази комбинирана формула се преквалифицират 5,5% от изследваните участници и това се свързано с използваните детерминанти за креатинин и за цистатин С. Inker и сътр. (80) 2012 г. използват осъвременените 4 формули за изчисление на ГФ. Те намират, че формулите с креатинин са недостатъчно точни и водят до свръх диагноза на ХБЗ. Комбинираната формула с цистатин С и креатинин дава по-добра прецизност и акуратност за класифициране на ГФ и препоръчват нейното използване. Наскоро Shlipak (178) през 2013 г. доказва, че добавянето на цистатин С към креатинина за определяне прогнозната скорост на ГФ, подобрява точността. С комбинираната формула се подобрява и прекласификацията на болните. Той приема ГФ, като клиничен стандарт за оценка на бъбречната функция. Roos et al (166) правят системен преглед чрез сравняване на диагностичната точност на цистатин С с серумния креатинин, което включва проучвания, които оценяват точността на цистатин С за всички степени на бъбречна функция. Те съобщават, че цистатин С е надежден маркер за ГФ при пациенти с леко до умерено нарушена бъбречна функция. **Цистатин С демонстрира по-голям шанс за откриване на истинската бъбречно увреждане, в сравнение със серумния креатинин.** Наскоро Larson (107) също така смята, че цистатин С има по-добри дискриминационни възможности от клирънсът с йохексолът за ГФ. Цистатин С е алтернативен маркер за ГФ с по-силно и по-линейно отношение към риска (178). Последните 1-2 г. все повече автори застъпват това становище. Установяваме, че концентрацията на цистатин С е свързана с възраст, индекс на телесна маса, креатинин и ГФ. Shlipak (178-182) установява, че серумният цистатин С е по-добър предиктор за "предклинична" бъбречна дисфункция. Други автори намират, че ГФ оценена с цистатин С прогнозира по-добре бъбречни и сърдечно-съдови заболявания, отколкото ГФ определена с креатинин в диабетици и недиабетици. Големи проучвания откриват, че албуминурия

A2 има един от всеки трима души с диабет, един от седем с високо кръвно налягане, но не диабет, и един от всеки шест лица на възраст над 60 години (107, 199). Krolewski и Warram (103) в изследване на две кохорти от пациенти с диабет заключава, че бъбречната функция, оценява с цистатин С, значително подобрява прогнозата на риска от прогресия до ТБН в сравнение с прогнозата, постигнати с креатинин.

Хронична бъбречна недостатъчност дефинирана, като намалена бъбречна функция ($\text{ГФ} < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) и/или доказателства за увреждане на бъбреците (установени албуминурия или протеинурия) за период от най-малко три месеца е голям проблем и за нашата страна. Не всички пациенти с ХБЗ в ранните стадии имат намалена ГФ и значителна част могат да бъдат открити само чрез оценка на албуминурия или протеинурия (28, 88). В потвърждение на това са и нашите резултати при четирите групи болни. Докато албуминурията респ. протеинурията се препоръчва да се проследява през 3-4 месеца, ГФ се препоръчва да се изследва на 6 м. - 1-2 г. Американската диабетна асоциация препоръчва да се определя албуминурията след установяване на диабет тип 2 и след есенциална хипертония без да се изчаква определено време (15). Ако пациентите са с обезитас, инсулинова резистентност и са пушачи изследването се налага още повече, защото албуминурията се засилва при тези допълнителни фактори.

Според препоръките на NKF и KDOQI, KDIGO и IFCC (92, 94, 145, 164) от 2012 – 2013 г., ХБЗ се определя, като аномалии на бъбречната структура или функция за период над 3 месеца с последици за здравето. То следва да се класифицира въз основа на тройката (CGA): причина, ГФ и албуминурия. Прогнозата на ХБЗ се определя от причината, категорията на ГФ и категорията на албуминурията. Критериите за хронична бъбречна недостатъчност са албуминурия A2 и $\text{ГФ} < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ с продължителност над 3 месеца. Затова следвайки тези препоръки и

търсейки ХБЗ вследствие на диабет, хипертония и хронични първични бъбречни заболявания, проследихме маркери за увреждане на гломерулите (белтъчни маркери начело с албуминурия и АСР) и за оценка на бъбречната функция (ГФ оценена чрез креатинин и цистатин С). **Ние също установихме известно разминаване между албуминурията и АСР, както и между протеинурията и РСР от една страна и ГФ от друга страна във всички изследвани групи.** Белтъчните показатели (албумин и ОБ в урината, АСТ и РСР) се променят по-често и по-силно в сравнение с ГФ. Процентът на болните с нормална албуминурия А1 е най-висок при хипертониците (60,1%), следван от диабетиците без хипертония (51,3%) и диабетици с хипертония (47,5%) и най-нисък при бъбречно болните (35%). **Белтъчните маркери са по-подходящи и за мониториране прогресията на заболяването.** От друга страна промените в албуминурия са променливи, докато промените в ГФ обикновено са прогресивни. Оценката на ГФ продължава да се смята за най-добрият индекс за нивото на бъбречната филтрация (94, 104). Намалението на ГФ обикновено е съпроводено от увеличаване на албуминурия, макар да има случай при които се наблюдава неалбуминов път към бъбречно увреждане (88, 92, 145). Нивото на ГФ е силен предиктор на времето за поява на бъбречна недостатъчност и риск от усложнения при ХБЗ. Вместо определяне на ГФ само на серумния цистатин С или само с креатинин, по-добре е да се оценява ГФ с комбинираната формула. Албуминурията и ГФ имат важна роли при стратифициране на риска от ХБЗ и ССЗ. **Ние смятаме, че оптималното откриване на ХБЗ изисква едновременното определяне на ГФ чрез комбинираната формула и на протеинурията чрез албуминурия и АСР, както и ОБ в урината и РСР.** За предпочитане е албуминурията и протеинурията да се изследват в първа сутришна урина, заедно с АСР и РСР. Промените в албуминурията може да отразяват отговор към терапията и риска за прогнозата (92, 145, 157). Нашите данни

също са в съгласие с авторите (15, 76), които установяват, че албуминурия А2 е най-ранния индикатор за ХБЗ при диабет и хипертония. Тези пациенти имат висок риск за таргетна органна увреда, като инсулт, ретинопатия и други. С оглед наличието на известна вариабилност на екскрецията на албумин с урината и АСР ние предлагаме един положителен резултат да бъде повторен след 1-3 месеца. Освен това според нас е нужно проследяването и на ОБ и РСР при диабетици и хипертоници. По принцип при увеличение на ОБ се регистрира и увеличение на албумина, но въпреки това имаме случаи на разминаване на АСР с РСР, както и случаи на леко увеличение на албумина без това на ОБ. **Връзката на АСР с РСР не е линейна.** Установихме увеличение на отношението албумин/ОБ спрямо контролите (0.238) при диабетици без и със хипертония (0.435 и 0.436), както и при пациенти с първична хипертония (0.351). Несъмнено, колкото по-високо е това отношение и колкото по-висок е процентът на албумина от ОБ, толкова по-тежко е увредена гломерулната филтрационна мембрана. При сравнение на различните наши групи, установяваме, че повишена албуминурия А2 и А3 е най-честа при ХПБЗ (65,4%), следва диабетици с хипертония (52,5%), диабетици без хипертония (48,6%) и най малко при хипертониците (39,5%). АСР, ОБ и РСР следват същата тенденция. На този фон намаление на ГФ $< 60 \text{ mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$ наблюдаваме в групите, както следва: при ХПБЗ 32,7%, при диабетици без хипертония 21,1%, при диабетици с хипертония 13% и при хипертоници 8,6%. Концентрацията на албумина в урината корелира по-силно със серумния цистатин С ($r=0.514$, $p<0.01$) отколкото със серумния креатинин ($r=0.232$, $p<0.5$) при диабетиците и хипертоници. Установената от нас дислипидемия при диабетици и хипертоници ни дава право да допускаме, че липидният метаболизъм може да играе роля в развитието на промени в гломерулите водещи до албуминурия и намалена ГФ. **Получените от това проучване**

резултати показват, че цистатин С е ендегенен, ценен, полезен, неинвазивен показател, който следва да намери място и в нашата страна за оценка на ГФ при диабетици и хипертоници. Скрининг за албуминурия А2 трябва да бъде стратегия за диабетици и хипертоници у нас.

В заключение смятаме, че е нужно и в нашата страна да се въведе и използва биомаркера цистатин С, който заедно с креатинина разширява и подобрява оценката на ГФ, така необходима при диагностиката на ХБЗ в резултат на диабет, хипертония и първични бъбречни заболявания. Успоредно с ГФ, даже преди нея е нужно определянето на белтъчните маркери – албумин и общ белтък в урината, АСR и РСR. Те трябва да се изследват в първа сутрешна урина, което е по-лесно и по-малко натоварено с грешки. Не на последно място и в нашата страна следва да се използва названието албуминурия А1, А2 и А3 вместо микроалбуминурия и макроалбуминурия, което е по точно и препоръчано от международните организации. Колкото по-рано започне изследването на албумина в урината и АСR, ОБ и РСR, и успоредно или малко след това и оценка на ГФ с креатинин и цистатин С при диабетици и хипертоници, още от началото на заболяването, толкова по-малък е рискът от хронична бъбречна недостатъчност, сърдечно-съдови заболявания и преждевременна смъртност.

7 ИЗВОДИ

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

2. Подбрана е референтна група от 153 индивида, с която са изградени референтни стойности за цистатин С в кръвен серум, албумин и общ белтък в урината, АСR и РСR, ГФ само с креатинин, само с цистатин С и с комбинация от креатинин и цистатин С.

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

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

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

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

7. Двата маркера албуминурия с АСR и ГФ се разминават между 10 и 30% в различните групи болни с диабет, с диабет+хипертония, с

есенциална хипертония и с ХПБЗ и това налага едновременното им използване.

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

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

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

11. Получените от нас резултати показват, че цистатин С е ендегенен, ценен, полезен, неинвазивен показател, който следва да намери място и в нашата страна за оценка на ГФ при диабетици и хипертоници. Скрининг за албуминурия А2 трябва да бъде стратегия за диабетици и хипертоници у нас.

8 ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев, Е., Р. Кръстева, Б. Богов, Б. Кипарова. Влияние на гломерулната филтрация, изчислена по Cockcroft-Gault формулата, върху плазмените нива на хомоцистеина. Нефрол. Хемодиал. Транспл., 6, 2000, 30-33.
2. Буева, А. Протеинурията. Урол. Нефрол., 2012, 24-28.
3. Делийска, Б. Възможности за ранно откриване на хронична бъбречна недостатъчност. Урол. Нефрол, 2012, 12-13.
4. Михайлов, Р., Цистатин С - нов биомаркер за оценка на бъбречната функция, Мед. Маг., 22, 2013, 14 – 17.
5. Михайлов, Р., Б. Пенчева, В. Василев, В. Стоянова. Цистатин С - референтни граници, значение за клиничната практика, Мед. Преглед, 46, 2010, 52-57.
6. Паскалев, Е., Н. Койчева, Л. Ламбрева и др. Цистатин С за определяне на бъбречната функция, Нефрол. Хемод. Трансп., 6, 2000, 8-11.
7. Тенева, Б., Корелация на серумния цистатин С и сръмния креатинин с креатининовият клирънс при чернодробна цироза. Акт. Нефрол., 11, 2011, 16-21
8. Abisi, S., K.G. Burnand, M. Waltham et al. Cysteine protease activity in the wall of abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg, 46, 2007, 1260-1266.
9. Abraham, C.B. Urinary markers of Glomerular injury in Diabetic nephropathy. Int J Nephrol, 2012, 2012, Pathol, 170, 2007, 809-817.
10. Abrahamson, M., I. Olafsson, A. Palsdottir et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. Biochem J, 268, 1990, 287-294.
11. Adler, A.I., R.J. Stevens, S.E. Manley et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes. Kidney Int, 63, 2003, 225–232.
12. Agarwal, S., M. Shlipak, H. Kramer et al. The Association of chronic kidney disease and metabolic syndrome with incident cardiovascular events. NEJM, 352, 2005, 2049-2060.
13. Akerblom, A., W. Lars, A. Siegbanh . Cystatin C and Estimated Glomerular Filtration Rate as Predictors for Adverse Outcome in Patients with ST-Elevation and Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: Results from the Platelet Inhibition and Patient Outcomes Study. Clin Chem, 58, 2012, 190-199.
14. Arimoto, T., Y. Takeishi, T. Niizeki et al. Cystatin C, a novel measure of renal function is an independent predictor of cardiac events in patients with heart failure. J Card Fail, 11, 2005, 595-601.
15. Basi, S., P. Fesler, A. Mimran et al. a Microalbuminuria in Type 2 Diabetes and Hypertension. Diab. Care, 31, 2008, Supp. 2 S194-S201.
16. Bauer, C., M. Melamed, T. Hostetter et al. Staging of Chronic Kidney Disease: Time for a course Correction. J Am Soc Nephrol, 19, 2008, 844-846.
17. Bellomo, R., C. Ronco, J.A. Kellum et al. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care, 8, 2004, R204-212.
18. Bevc, S., R. Hojs, R. Ekart et al. Formula for Estimation of Glomerular Filtration Rate in Overweight Patients with Diabetes Mellitus Type 2 and Chronic Kidney Disease. Exper Diabet Res, 2012, 2012, 214-219.
19. Bokenkamp, A., J.A. van Wijk, M.J. Lentze. Effect of corticosteroid therapy on serum cystatin C and beta2-microglobulin concentrations Clin Chem, 48, 2002, 1123-1126.
20. Bokenkamp, A., M. Domanetzki, R. Zinck et al. Cystatin C - a new marker of glomerular filtration rate in children that is independent of age and height, Pediatrics, 101, 1998, 875-881.

21. Bokenkamp, A., M. Domanetzki, R. Zinck et al. Reference values for cystatin C serum concentrations in children. *Pediatr Nephrol*, 12, 1998, 125-129.
22. Bolognani, G. Serum creatinine and the search for new biomarkers of acute kidney injury (AKI): the story continues. *Clin Chem Lab Med*, 50, 2012, 1494-1500.
23. Boutten, A., S. Bargnoux, M. Carlier. Enzymatic but not compensated Jaffe methods reach the desirable specifications of NKDEP at normal levels of creatinine. Results of the French multicentric evaluation. *Clin Chim Acta*, 419, 2013, 132-135.
24. Bouzas, L., J.C.Tutor. Macromolecular complexes of cystatin C with circulating liver plasma membrane fragments and determination of serum cystatin C using the particle enhanced nephelometric immunoassay (PENIA) in kidney and liver transplantation and biliary obstruction. *Clin Lab*, 57, 2011, 207-212.
25. Brown E, Cystatin C; A new standard to measure GFR. *JASN*, 6, 2011, 1599-1608.
26. Burtis, C.A., E.R. Ashwood, D.E.Bruns DE, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. eds. 5th edition, St. Louis: Elsevier Saunders; 2011.
27. Caregato, L., F. Menon, P. Angeli et al. Limitations of serum creatinine level and creatinine clearance as filtration markers in cirrhosis. *Arch Intern Med*, 154, 1994, 201-205.
28. Ceriotti, F., J.Boyd, G.Klein G et al. Reference Intervals for Serum Creatinine Concentrations: Assessment of Available Data for Global Application. *Clin Chem*, 54, 2008, 559-566
29. Chew, J., M.Saleem, C. Florkowski et al. Cystatin C - A Paradigm of Evidence Based Laboratory Medicine. *Clin Biochem Rev*, 29, 2008, 47-62.
30. Chew-Harris, A. The relative effects of fat versus muscle mass on cystatin C and estimates of renal function in healthy young men. *Ann Clin Biochem*, 50, 2013, 39-46.
31. Cimerman, N., P.M. Brguljan, M. Krasovec et al. Serum cystatin C, a potent inhibitor of cysteine proteinases is elevated in asthmatic patients. *Clin Chim Acta*, 300, 2000, 83-95.
32. Cocker, J., J.Masson, D.Warren. Creatinine adjustment of biological monitoring results, *Occup Med (Lond)*, 61, 2011, 349-353.
33. Cockcroft, D., M. Gault . Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16, 1976, 31-41.
34. Coll, E., A.Botey, L.Ivarez, et al. Serum Cystatin-C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *Am J Kidney Dis*, 36, 2000, 29-34.
35. Coresh, J., B.C. Astor, T. Greene et al. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population. *Am J Kidney Dis*, 41, 2003, 1-12.
36. Corrao, A.M., G. Lisi, G. Di Pasqua et al. Serum cystatin C as a reliable marker of changes in glomerular filtration rate in children with urinary tract malformations . *J Urol*, 175, 2006, 303-309.
37. Counahan, R., C. Chantler, S. Ghazali et al. Estimation of glomerular filtration rate from plasma creatinine concentration in children. *Arch Dis Child*, 51, 1976, 875-878.
38. Croda-Todd, M.T., X.J. Soto-Montano, P.A.Hern et al. Adult cystatin C reference intervals determined by nephelometric immunoassay. *Clin. Biochem*, 40, 2007, 1084-1087.
39. Damman, K, van der Harst P, Smilde TDJ, et al, Use of Cystatin-C levels in estimating renal function and prognosis in patients with chronic systolic heart failure. *Heart*, 98, 2012, 319-24.
40. Davey, R.X. Chronic kidney disease and automatic reporting of estimated glomerular filtration rate. *Med J Australia*, 184, 2006, 42-43.
41. De Zeeuw, D.L., G.C. Curhan. Screening, Monitoring and Treatment of Albuminuria. *Am J Soc Nephrol*, 17, 2006, 2120-2126.

42. Delange, J.R., M.Speaert. Creatinine determination according Jaffe – what does it stand for? *CKJ*, 4, 2011, 83-86.
43. Demirta, S., O.Akan, M.Can et al. Cystatin C can be affected by nonrenal factors: a preliminary study on leukemia. *Clin. Biochem.* 39, 2006, 115-118.
44. Deo, R., N.Sotoodehnia, R. Katz et al. Cystatin C and Sudden Cardiac Death Risk in Elderly. *Circulation*, 3, 2010, 159-164.
45. Deo, R., C.L. Fyr, L.F.Fried et al. Kidney dysfunction and fatal cardiovascular disease - an association independent of atherosclerotic events. *Am Heart J*, 155, 2008, 62-68.
46. De Santo, N.G., M. Cirillo, A. Perna et al. The kidney in heart failure. *Semin Nephrol*, 25, 2005, 404-407.
47. De Silva, R., N.P. Nikitin, K. Witte et al. Incidence of renal dysfunction over 6 months in patients with chronic heart failure due to left ventricular systolic dysfunction: contributing factors and relationship to prognosis. *Eur Heart J*, 27, 2006, 569-581.
48. Dharnidharka, V.R., C. Kwon, G. Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 40, 2002, 221-226.
49. Dickstein, K., A.Cohen-Solal, G. Filippatos et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*, 29, 2008, 2388-2442.
50. Djousse, L., T. Kurth, J.Gaziano. Cystatin C and risk of heart failure in the Physicians' Health Study (PHS). *Am. Heart J*, 155, 2008, 82-86.
51. Donadio, C., A.Kanaki, F.Caprio F, et al. Prediction of glomerular filtration rate from serum concentration of cystatin C: comparison of two analytical methods. *Nephrol Dial Transplant*, 27, 2012, 2826- 2838.
52. Draft for Consultation. February, 2014, pp.39-60.
53. Eriksson, P., K.G. Jones, L.C. Brown. Genetic approach to the role of cysteine proteases in the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg*, 91, 2004, 86-89.
54. Fassett, R.G., S.K.Venuthurupalli, G.C. Gobe et al. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney Int*, 80, 2011, 806-821.
55. Filler, G., A.Benkamp, W. Hofmann et al. Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clin. Biochem*, 38, 2005, 1-8.
56. Finney, H., D.J. Newman, W.Gruber et al. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems. *Clin Chem*, 43, 1997, 1016-1022.
57. Finney, H., D.J. Newman, C.P. Price. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem*, 37, 2000, 49-59.
58. Finney, H, D.J.Newman, H.Thakkar et al. Reference ranges for plasma cystatin C and creatinine measurements in premature infants, neonates, and older children. *Arch Dis Child*, 82, 2000, 71-75.
59. Flegar, Z., S.Perkov, B.Simonovic et al. Applicability of common reference intervals for serum creatinine concentrations to the Croatian population. *Clin Chem Lab Med*, 48, 2010, 231-235.
60. Font, R., M.Prat, M.Vea et al. Is there a relationship between cystatin C and inflammatory status, oxidative stress and other cardiovascular risk factors in non-diabetic patients with chronic kidney disease? *Nefrologia*, 29, 2009, 228-235.
61. Franceschini, N., C. Qiu, D.A. Barrow. Cystatin C and preeclampsia: a case control study. *Ren Fail*, 30, 2008, 89-95.
62. Fuhrman, D., P. Maier, J. Schwartz. Rapid assessment of renal reserve in young adults by cystatin C. *Scand. J Clin Lab Invest*, 63, 2013, 1944-1947.
63. Gautier, S., J. Kaur, W. Mi et al. Protective mechanism by cystatin C in neurodegenerative diseases. *Biochem Sci*, 3, 2011, 541-554.

64. Go, A.S., G.M. Chertow, D. Fan et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *NEJM*, 351, 2004, 1296-1305.
65. Groesbeck, D., A. Kottgen, R.Parek et al. Gender, and Race Effects on Cystatin C levels in US Adolescent, *CJASN*, 3, 2008, 1777-1785.
66. Grubb, A. Srecific proteins as renal function markers, *Eurolabmed*, Milano, 2013, abstract SYO02.
67. Grubb, A., U. Niman, S. Blirup-Jensen et al. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC. *Clin Chem Lab Med*, 48, 2010, 1619-1621.
68. Grubb, A., U. Niman, B. Jonas et al. Simple Cystatin C-Based Prediction Equations for Glomerular Filtration Rate Compared with the Modification of Diet in Renal Disease Prediction Equation for Adults and the Schwartz and the Counahan-Barratt Prediction Equations for Children. *Clin Chem*, 51, 2005, 1420-1431.
69. Guh, A. Proteinuria versus Albuminuria. *Nephrology (Carlton)*, 15, 2010, Supp. 2. 1420-1431.
70. Gunzler, D., A. Bleyer, R.L.Thomas. Diabetic nephropathy I a sibling and albuminuria predict early GFR decline: a prospective cohort study. *BMC Nephrology*, 14, 2013, 124-129.
71. Haenggi, M.H., J. Pelet, J.P. Guignard. Estimation of glomerular filtration rate by the formula. *Arch Nephrol*, 6, 1999, 165-172.
72. Halbesma, N., D. Kuiken, A. Brantsma. Microalbuminuria is a Better Risk Marker than Estimated GFR to identify Individuals at Risk for Accelerated GFR Loss in Population screening. *J Am Soc Nephrol*, 17, 2006, 2582-2590.
73. Harvey, J.N., K. Hood, J.K. Platts et al. Prediction of albumin excretion rate from albumin-to-creatinine ratio. *Diabetes Care* 1999, 22, 1597-1598.
74. Henskens, Y., I.C. Veerman, A. Nieuw. Cystatins in health and disease. *Biol. Chem*, 377, 1996, 71-86.
75. Hermida, J., J.C.Tutor. Serum cystatin C for the prediction of glomerular filtration rate with regard to the dose adjustment of amikacin, gentamicin, tobramycin, and vancomycin. *Ther Drug Monit*, 28, 2006, 326-331.
76. Hitha, B., J.M. Pappoehan, H. Balanchandran. Microalbuminuria in Patients with Essential Hypertension and its Relationship to Target Organ Damage. *Scand J Kidney Dis and Transp*, 19, 2008, 411-419.
77. Hoek, F.J., F.A. Kemperman, R.T. Krediet. A comparison between Cystatin-C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant*, 18, 2003, 2024-31.
78. Horio, M., E. Imai, J. Yasuda. GFR Estimation using standardized serum cystatin C in Japan. *Scan J Clin Lab Invest*, 63, 2013, 1944-1947.
79. Hossain, M.A., M. Emara. Comparing Measures of Cystatin C in Human Sera by Three Methods. *Am J Nephrol*, 29, 2009, 381-391.
80. Inker, L.A., C.H.Schmidt, H.Tighiouart et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *NEJM*, 367, 2012, 20-29.
81. Ingelfinger, J.R., P.Marsden. Estimated GFR and Risk of Death – Is cystatin C useful? *NEJM*, 369, 2013, 974-975.
82. Ix, J.H., M.G. Shlipak, G.M.Chertow et al. Association of cystatin C with mortality, cardiovascular events, and incident heart failure among persons with coronary heart disease. *Circulation*, 115, 2007, 173-179.
83. Jaffe, M . Uber den Niederschlag welchen Pikrinsaure in normalen Harn erzeugt und uber eine neue Reaction des Kreatinins. *Z Physiol Chem*, 10, 1886, 391-400.
84. Jakob, S.M., W. Arnold, H-P. Marti. Progressive renal failure after cisplatin therapy. *Nephrol Dial Transplant*, 11, 1996, 370-373.

85. Jeon, Y., M. Kim, J. Huh. Cystatin C as an Early Biomarker of Nephropathy in Patients with DM type 2. *J Korean Med Sci*, 26, 2011, 258-263.
86. Jernberg, T., B. Lindahl, S. James et al. Cystatin C: a novel predictor of outcome in suspected or confirmed non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*, 110, 2004, 2342-2348.
87. Johns, K.W., R. Robinson, I.M. Wilson, Does the albumin:creatinine ration lack clinical utility in predicting microalbuminuria. *BCM J*, 48, 2006, 399-403.
88. Johnson, D.W., G. Jones, T. Mathew et al. Chronic kidney disease and measurement of albuminuria or proteinuria: a position statement. *JAMA*, 197, 2012, 224-225.
89. Kaeser, S.A., M.C. Herzig, J. Coomaraswamy et al. Cystatin C modulates cerebral beta-amyloidosis. *Nat Genet*, 39, 2007, 1437-1439.
90. Kallner, A., P.A. Ayling, Z. Khatami Z. Does GFR improve the diagnostic capability of S-Creatinine concentration results? A retrospective population based study. *Int J Med Sci*, 5, 2008, 9-17.
91. Kapmeyer, W.H., H.E. Pauly, A. Tuengler., Automated nephelometric immunoassays with novel shell/core particle. *J Clin Lab Anal*, 2, 1988, 76-83.
92. KDIGO .Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*, sup. 3, 2013, 1-150.
93. KDOQI, Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, Clinical Practice Guideline for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis*, 39, 2002, S1-S266.
94. KDIGO, Contravercies conference 2012. Albuminuria versus GFR as a markers of diabetic CKD progression, New Delhi, March, 2012.
95. Khyse-Anderson, J., C. Schmidt, G. Nordin et al, Serum cystatin C, determined by a rapid automated particle enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine of glomerular filtration rate. *Clin Chem*, 40, 1994, 1921-1926.
96. Kim, S.S., S.H. Song, I.J. Kim et al. Urinary cystatin C and tubular proteinuria predict progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 36, 2013, 656-661.
97. King, A.J., A.S. Levey. Dietary protein and renal function. *J Am Soc. Nephrol*, 3, 1993, 1723-1737.
98. Knight, E.L., J.C. Verhave, D. Spiegelman et al. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int*, 65, 2004, 1416-1421.
99. Koenig, W., D. Twardella, A. Brenner et al. Plasma concentrations of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than simply a marker of glomerular filtration rate. *Clin. Chem*, 51, 2005, 321-327.
100. Kos, J., M. Krasovec, N. Cimerman. Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Clin Cancer Res*, 6, 2000, 505-511.
101. Kos, J., B. Stabuc, N. Cimerman. Serum cystatin C, a new marker of glomerular filtration rate, is increased during malignant progression. *Clin. Chem.*, 44, 1998, 2556-2557.
102. Krishna, D., M. Rahul, M. Suma et al. Role of Cystatin-C in assessing the cardiovascular risk among overweight and obese individuals. *Int J Health Allied Sci*, 1, 2012, 16-19.
103. Krolewski, A., J. Warram, Serum Concentration of Cystatin C and Risk of End-Stage Renal Disease in Diabetes. *Diabetes Care*, 35, 2012 2311-2316.
104. Kumar, A., S. Kapaor, R.C. Gupta. Comparison of Urinary protein:creatinine index for determination of Microalbuminuria. *J Clin Diagn Res*, 7, 2013, 622-626.
105. Khyse-Andersen, J., C. Schmidt, N. Gunnar et al. Serum cystatin C determined by rapid automated Particle-Enhanced turbidimetric method, *Clin Chem*, 40, 1994, 1921-1926.

106. Lamb, E.J., S.E. O'Riordan, M.C. Webb. Serum cystatin C may be a better marker of renal impairment than creatinine. *J Am Geriatr Soc*, 51, 2003, 1674-1675.
107. Larsson, A. Blood pressure and chronic kidney disease progression in a multi-racial cohort. *J. Hum Hypert*, 27, 2013, 403-404.
108. Lassus, J., V. Harjola, R.Sund et al, Prognostic value of Cystatin-C in acute heart failure in relation to other markers of renal function and NT-proBNP. *Eur Heart J*, 28, 2007, 1841-1847.
109. Laterza, O., P.Christopher. Cystatin C: An Improved Estimator of Glomerular Filtration Rate? *Clin Chem*, 48, 2002, 699-707.
110. LeBricon, T., E.Thervet, M. Froissant et al. Plasma cystatin C is superior to creatinine clearance for estimation of GFR three months after kidney transplantation. *Clin Chem*, 46, 2000, 1206-1207.
111. Lee, M., J.L.Saver, W.H. Huang et al. Impact of elevated cystatin C level on cardiovascular disease risk in predominantly high cardiovascular risk populations: a meta-analysis. *C irculation*, 3, 2010, 675-683.
112. Levey, A.S., J.P. Bosch, J.B.Lewis et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*, 130, 1999, 461-470.
113. Levey, A.S., T. Greene, J.W. Kusek et al. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol*, 11, 2000, (suppl) 155A.
114. Levey, A.S., J. Coresh, E. Balk et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med*, 139, 2003, 137-147.
115. Levey, A.S., J. Coresh, T. Greene et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann. Inter Med*, 145, 2006, 247-254.
116. Levey, A.S. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 150, 2009, 604-612.
117. Levin, A., B.Hemmelgarn, B.Culleton et al. Guidelines for the management of chronic kidney disease, Serum cystatin C and prediabetes in non-obese US adults. *CMAJ*, 179, 2008, 1154-1562.
118. Levy, E., M. Jaskolski, A.Grubb. The role of cystatin C in cerebral amyloid angiopathy and stroke: cell biology and animal models. *Brain Pathol*, 16, 2006, 60-70.
119. Levy, E., C. Lopez-Otin, J. Ghiso et al. Stroke in Icelandic patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases. *J Exp Med*, 169, 1989, 1771-1778.
120. Lewis, A.V., T.J. James, J.B. McGuire et al. Improved immunoturbidimetric assay for cystatin C. *Ann Clin Biochem*, 38, 2001, 111-114.
121. Lofberg, H., A.O.Grubb AO. Quantitation of γ -trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand J Clin Lab Invest*, 39, 1979, 619-626.
122. Macdonald, J., S.Marcora, M. Jibani et al. GFR estimation using cystatin C is not independent of body composition. *Am J Kidney Dis*, 48, 2006, 712-719.
123. Marakala, V., S.Avinash, A.Sivashankara et al. Serum Creatinine assay: Enzymatic Vs Kinetic Jaffe's method. *JEMDS* 2012, 10, 1-5.
124. Masson, I., N. Mailland, J.Tack. GFR estimation using standardized cystatin C in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis*, 61, 2013, 279-284.
125. Mathew, T.H., D.W. Johnson, G.R. Jones. Chronic kidney disease and automatic reporting of estimated glomerular filtration rate: revised recommendations. *Med J Aust*, 187, 2007, 459-463.

126. Matsushita, K., E. Selvin, L.D. Bash. Risk implications of the new CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation compared with the MDRD Study equation for estimated GFR: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Kidney Dis*, 55, 2010, 648-659.
127. Matsushita, K., M. Velde, B.C. Astor et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*, 75, 2010, 2073-2081.
128. Mayo Med. Lab. Serum Cystatin C for Renal Function Assessment. A New Particle-Enhanced Turbidimetric Assay, July, 2011.
129. McAlister, F.A., J. Ezekowitz, M. Tonelli et al. Renal insufficiency and heart failure. *Circulation*, 109, 2004, 1004-1009.
130. McClellan, W.M., W.D. Flanders, R.D. Langston. Anemia and renal insufficiency are independent risk factors for death among patients with congestive heart failure admitted to community hospitals: a population based study. *J Am Soc Nephrol*, 13, 2002, 1928-1936.
131. McCullough, P.A. Why is chronic kidney disease the "spoiler" for cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol*, 41, 2003, 725 – 728.
132. McNamara, N.V., R. Chen, M.R. Janu et al. Early renal failure detection by cystatin C in Type 2 diabetes mellitus: varying patterns of renal analyte expression. *Pathology*, 41, 2009, 269-275.
133. Miller, W.G. Estimating glomerular filtration rate. *Clin Chem Lab Med*, 47, 2009, 1017-1019.
134. Morgan, K.P., L.W. Buie, S.W. Savage. The role of mannitol as a nephroprotectant in patients receiving cisplatin therapy. *Ann Pharmacother*, 46, 2012, 276-281
135. Muntner, P., J. Winston, J. Uribarri et al. Overweight, obesity, and elevated serum cystatin C levels in adults in the United States. *Am J Med*, 121, 2008, 341-348.
136. Mussap, M., M. Dalla, P. Fioretto et al. Cystatin-C is more sensitive marker than creatinine for estimation of GFR. *Kidney Int*, 61, 2002, 1453-1461.
137. Myers, G.L., W.G. Miller, J. Coresh et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem*, 52, 2006, 5-18.
138. Nakai, K., M. Kikuchi, K. Fujimoto et al. Serum levels of cystatin C in patients with malignancy. *Clin Exp Nephrol*, 12, 2008, 132-139.
139. Narayanan, S., H.D. Appletan. Creatinine: a review. *Clin Chem*, 26, 1980, 1119 – 1126.
140. Nathan, D.M., C. Rosenbaum & D. Protasowicki D. Single-void urine samples can be used to estimate quantitative microalbuminuria. *Diabetes Care*, 1987, 10, 414-418.
141. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines to define chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis*, 39, 2002, S1-S26.
142. Newman, D.J. Cystatin C. *Ann Clin Biochem*, 39, 2002, 89-104.
143. Newman, D.J., H. Thakkar, R.G. Edwards et al. Serum cysC measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int*, 47, 1995, 312-318.
144. Nilsson-Ehle, P., A. Grubb. New markers for the determination of GFR: iohexol clearance and cystatin C serum concentration. *Kidney Int*, 46, 1994, 17-19.
145. NKDEP, National Kidney Disease Education Program, 2013.
146. Ochieng, J., G. Chaudhuri. Cystatin Superfamily. *J Health Care*, 21, 2010, Suppl. 51-70.

147. Oddoze, C., S. Morange, H. Portugal et al. Cystatin C is not more sensitive than creatinine for detecting early renal impairment in patients with diabetes. *Am J Kidney Dis*, 38, 2001, 310-316.
148. Ognibene, A., E. Mannucci, A. Caldini et al. Cystatin C reference values and aging. *Clin. Biochem*, 39, 2006, 658-661.
149. Olafsson, I. The human cystatin C gene promoter: functional analysis and identification of heterogeneous mRNA. *Scand J Clin Lab Invest*, 55, 1995, 597-607.
150. O'Riordan, S.E., M.C. Welb, H.J. Stowe et al. Cystatin C improves the detection of mild renal dysfunction in older patients. *Ann Clin Biochem*, 40, 2003, 648-655.
151. Peake, M., M. Whiting. Measurement of serum creatinine - current status and future goals. *Clin Biochem Rev*, 27, 2006, 173-184.
152. Pencina, M.J., R.B. D'Agostina, E.W. Steyerberg. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Statist Med*, 30, 2011, 11-21.
153. Peralta, C.A., R. Katz, M.J. Sarnak et al. Cystatin C identifies chronic kidney disease patients at higher risk for complications. *J Am Soc Nephrol*, 22, 2011, 147 - 155.
154. Peralta, C.A., M.G. Shlipak, S. Judd et al.: Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA*, 305 2011, 1545-1552.
155. Perkins, B.A., R.G. Nelson, B.E. Ostrander et al. Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study. *J Am Soc Nephrol*. 16, 2005, 1404-1412.
156. Pontremoli, R., A.Sofia, M.Ravera et al. Prevalence and Clinical Correlates of Microalbuminuria in Essential Hypertension. *Hypertension*, 30, 1997, 1135-1143
157. Poudel, B., B.K.Yadav, K.B.Raut. Prevalence and Association of Microalbuminuria in Essential Hypertension. *N Am J Med Sci*, 4, 2012, 331-335
158. Proteinuria. *Medscape*, 13 Sept, 2013.
159. Pucci, L., S.Triscornia, D. Lucchesi et al. Cystatin C and estimates of renal function: searching for a better measure of kidney function in diabetic patients. *Clin Chem*, 53, 2007, 480-488.
160. Rigalleau, V., M, C, Beauvieux, F. Le Moigne et al. Cystatin C improves the diagnosis and stratification of chronic kidney disease, and the estimation of glomerular filtration rate in diabetes. *Diabetes Metab*, 34, 2008, 482-489.
161. Risch, L., R. Herklotz, A. Blumberg et al. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem*, 47, 2001, 2055-2059.
162. Ristinien, N., Q. Qin, A. Postnikov et al. Dry-Reagent Double-Monoclonal Assay for Cystatin C. *Clin.Chem*, 56, 2010, 1424-1431.
163. Ristinien, N., J. Lund, R.Terti et al. Cystatin C as a predictor of all-cause mortality and myocardial infarction in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Clin Biochem*, 45, 2012, 535-540.
164. Rollins, G. The latest Guidance on Chronic Kidney Disease. *Clin Lab New*, 39, 2013, 10- 28 (KDIGO, *Kidney Inter. Suppl*, 2013, 3, 1-150)
165. Ronald, J., A. Hogg, S. Furth et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease in Children and Adolescents: Evaluation, Classification, and Stratification. *Pediatrics*, 111, 2003, 1416 - 1421.

166. Roos, J.F., J. Doust, S.E. Tett. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children--a meta-analysis. *Clin. Biochem*, 40, 2007, 383-391.
167. Rule, A.D., T.S. Larson, E.J. Bergstralh et al. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Intern Med*, 141, 2004, 929-937.
168. Sabanayagam, C., T.Y. Wong, J. Xiao et al. Serum cystatin C and prediabetes in non-obese US adults. *Eur J Epidemiol*, 54, 2013, 1335-1340.
169. Sahakyan, K., R. Klein, K. Lee et al. Serum Cystatin C and the Incidence of Hypertension in Type 1 Diabetes Mellitus. *Am J Hypertens*, 24, 2011, 59-63.
170. Sarnak, M.J., R. Katz, L.F. Fried et al. Cystatin C and aging success. *Arch Intern Med*, 168, 2008, 147-153.
171. Schwartz, G.J., L.G. Feld, D.J. Langford. A simple estimate of glomerular filtration rate in full-term infants during the first year of life. *J Pediatr*, 104, 1984, 849-854.
172. Schwartz, G.J., B. Gauthier, A simple estimate of glomerular filtration rate in adolescent boys. *J Pediatr*, 106, 1985, 522-526.
173. Schwartz, G.J., G.B. Haycock, C.M. Edelmann et al. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics*, 58, 1976, 259-263.
174. Schwartz, G.J., A. Mueoz, M.F. Schneider. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol*, 20, 2009, 629-637.
175. Servais, A., P. Giral, M. Bernard et al. Is serum cystatin C a reliable marker for metabolic syndrome? *Am J Med*, 121, 2008, 426-432.
176. Shemesh, O., H. Golbetz, J.P. Kriss. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int*, 28, 1985, 830-838.
177. Shi, G.P., G.K. Sukhova, A. Grubb et al. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 104, 1999, 1191-1197.
178. Shlipack, M.G. Cystatin C as a marker of glomerular filtration rate in chronic kidney disease: influence of body composition. *Nat Clin Pract Nephrol*, 3, 2007, 188-189.
179. Shlipack, M.G. Cystatin C: research priorities targeted to clinical decision making. *Am J Kidney Dis*, 51, 2008, 358-361.
180. Shlipack, M.G., R. Katz, L.F. Fried et al. Cystatin C and mortality in elderly persons with heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 45, 2005, 268-271.
181. Shlipak, M.G., R. Katz, M.L. Sarnak et al. Cystatin C and prognosis for cardiovascular and kidney outcomes in elderly persons without chronic kidney disease. *Ann Intern Med*, 145, 2006, 237-246.
182. Shlipak, M.G., M.J. Sarnak, R. Katz et al. Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *NEJM*, 352, 2005, 2049-2060.
183. Siest, G., J. Henny. The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med*, 51, 2012, 47-64.
184. Simonsen, O., A. Grubb, H. Thysell. The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest*, 45, 1985, 97-101.
185. Sjostrom, P., M. Tidman, I. Jones. Determination of the production rate and non-renal clearance of cystatin C and estimation of the glomerular filtration rate from the serum concentration of cystatin C in humans. *Scand J Clin Lab Invest*, 65, 2005, 111-124.
186. Skupien, J., J.H. Warram, A.M. Smiles et al.: The early decline in renal function in patients with type 1 diabetes and proteinuria predicts the risk of end-stage renal disease. *Kidney Int*, 82, 2012, 589-597.

187. Smith, G.L., J.H. Lichtman, M.B.Bracken et al. Renal impairment and outcomes in heart failure. Systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*, 47, 2006, 1987-1996.
188. Soares, A., T. Eyff, R. Campani. Performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Equations in Healthy South Brazilians. *Am J Kidney Dis*, 55, 2010, 1162-1163.
189. Soares, A., A. Pretes, L. Weinert. Reference values for glomerular filtration rate in healthy Brazilian adults. *BMC Nephrology*, 14, 2013, 54-61.
190. Sokoll, L., M. Robert, A. Russell et al. A Establishment of Creatinine Clearance Reference Values for Older Women. *Clin Chem*, 40, 1994, 2276-2281.
191. Solberg, H.E. Establishment and use of reference values, Burtis CA Ashwood ER eds. *Tietz textbook of clinical chemistry 3rd ed*, 1999, 336-356, WB Saunders Philadelphia.
192. Stabuc, B., L. Vrhovec, M. Stabuc-Silih. Improved prediction of decreased creatinine clearance by serum cystatin C: use in cancer patients before, during and after chemotherapy. *Clin Chem*, 46, 2000, 193-197.
193. Staples, A., R. LeBlond, S. Watkins et al. Validation of the revised Schwartz estimating equation in a predominantly non-CKD population. *Pediatr Nephrol*, 25, 2010, 2321-2326.
194. Stevens, L.A., J. Coresh, C.H. Schmid et al. Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3, 418 individuals with CKD. *Am J Kidney Dis*, 51, 2008, 395-406.
195. Stevens LA, Levey A, Schmid CH et al, Current status and future perspectives for GFR testing, *Am J Kidney Dis*, 53, 2009, Supp.S17-S26.
196. Stevens, L.A., A.S.Levey. Chronic kidney disease in the elderly--how to assess risk. *NEJM*, 352, 2005, 2122-2124.
197. Stevens, L.A, C.H. Schmid, Y.L. Zhang. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 150, 2009, 604-612.
198. Stickle D, Cole B, Hock K et al, Correlation of plasma concentrations of cystatin C and creatinine to inulin clearance in a pediatric populatio. *Clin Chem*, 44, 1998, 1334-1338.
199. Strevens, H., D.Wide-Swensson, A. Grubb et al. Serum cystatin C reflects glomerular endotheliosis in normal, hypertensive and pre-eclamptic pregnancies. *BJOG*, 110, 2003, 825-830.
200. Strevens, H., D.Wide-Swensson, O.Torffvit et al. Serum cystatin C for assessment of glomerular filtration rate in pregnant and non-pregnant women. Indications of altered filtration process in pregnancy. *Scand J Clin. Lab Invest*, 62, 2002, 141-147.
201. Strojjan, P., I. Oblak, B.Svetic. Cysteine proteinase inhibitor cystatin C in squamous cell carcinoma of the head and neck: relation to prognosis. *Br J Cancer*, 90, 2004, 1961-1968.
202. Suzuki, Y., K.Matsushita, M. Seimiya. A cystatin C as a marker for early detection of chronic kidney disease and grade 2 nephropathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Clin Chem Lab Med*, 50, 2012, 1833-1839.
203. Tapp, R.J., J.E.Shaw, P.Z.Zimmet et al. Albuminuria is evident in the early stages of diabetes onset. *Am J Kidney Dis*, 44, 2004, 792-798.
204. Taylor, E. H. Creatinine determination according to Jaffe. *Clin Chem*, 35, 1989, 58-62.
205. Teo, B., H. Hu, D. Wang. Estimating Glomerular Filtration Rates by Use of Both Cystatin C and Standardized Serum Creatinine. *Clin Chem*, 58, 2012, 450-457.
206. Tereos, E., D.Chkistoulas, E.Kastritis. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration Cystatin C (CKD-EPI-CysC) equation has an independent prognostic value for overall survival in newly diagnosed patients with symptomatic multiple myeloma; is it time to change from MDRD to CKD-EPI-CysC equations? *Eur J haematol*, 91, 2013, 347-355.

207. Tereps, E., D.Christoulas, E.Kastritis. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration Cystatin C (VKD-EPI-CysC)equation has an Independent prognostic value for overall survival in new diagnostic Patients with symptomatic myeloma; Is it time to change from MDRD to CKD-EPI-CysC equations?. *Eur J Haematol*, 91, 2013, 347-355.
208. Tonelli, M., N.Wiebe, B.Culleton et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*, 17, 2006, 2034-2047.
209. Tonelli, M., P. Muntner, A. Lloyd et al., Using proteinuria and estimated glomerular filtration rate to classify risk in patients with chronic kidney disease: a cohort study. *Ann Intern Med*, 154, 2011, 12-21.
210. Tonelli, M., M.C.Riella. Chronic Kidney Disease and the aging population. *Kidney Int*, 85, 2014, 487-491.
211. Tsai, C-W., M.Grams, L.Inker. Cystatin C– and Creatinine-Based Estimated Glomerular Filtration Rate, Vascular Disease, and Mortality in Persons With Diabetes in the U.S. *Diabetes Care*, 37, 2014, 1002-1008.
212. Uhlman, E., K.G.Hock, C. Issitt et al. Reference Intervals for Plasma Cystatin C in Healthy Volunteers and Renal Patients, as Measured by the Dade Behring BN II System, and Correlation with Creatinine. *Clin.Chem*, 47, 2001, 2031-2033.
213. Voskoboev, A., S. Timothy, A. Larson et al. Analytic and clinical validation of a standardized cystatin C particle enhanced turbidimetric assay (PETIA) to estimate glomerular filtration rate. *Clin Chem Lab Med*, 50, 2012, 1591-1596.
214. Waheed, S., K. Matsushita, Y. Sang et al. Combined association of albuminuria and Cystatin C based estimated GFD with mortality, coronary heart disease, and heart failure outcomes. *Am J Kidney Dis*, 24, 2012, 207-216.
215. Wallemac, P. *Meeting on Biomarkers of Organ Damage and Dysfunction*, EMBODY, 2000, Cambridge UK.
216. Warram, J.H., G. Gearin, L. Laffel et al. Effect of duration of type I diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. *J Am Soc Nephrol*, 7, 1996, 930-937.
217. Wasen, E., P.Suominen, R.Isoaho et al. Serum cystatin C as a marker of kidney dysfunction in an elderly population. *Clin Chem*, 48, 2002, 1138-1140.
218. Weir, M.R. Microalbuminuria and cardiovascular diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2, 2007, 581-590.
219. Westhuyzen, J. Review: Cystatin C: a Promising and Predictor of Impaired Renal Function. *Ann Clin Lab Sci*, 36, 2006, 387-394.
220. Wikipedia. Cystatin C., Bowman, s capsule, Proteinuria, Microalbuminuria.
221. Wyss, M., R. Kaddurah-Daouk. Creatine and creatinin metabolism. *Physiol.Rev*, 80, 2000, 1170-1213.
222. Yamamoto-Watanabe, Y., M. Watanabe, M. Jackson. Quantification of cystatin C in cerebrospinal fluid from various neurological disorders and correlation with G73A polymorphism in CST3. *Brain Res*, 18, 2010, 140-145.
223. Zahran, A., A. El-Husseini A, A. Shoker. Can Cystatin C replace Creatinine to estimate Glomerular Filtration Rate: A literature review. *Am J Nephrol*, 27, 2007, 197-205.
224. Zamora, E., J. Lup0n, J. Vila et al. Estimated glomerular filtration rate and prognosis in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 59, 2012, 1709-1715.
225. Zethelius, B., L. Berglund, J. SundstrOm et al. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes, *NEJM*, 358, 2005, 2107-2116.
226. Zhang A. and S. Huang. Progressin Pathogenesis of Proteinuria. *Int J Nephrol*, 2012, 2012, 314-351.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

Медицински факултет

Д-р Росен Димитров Михайлов

ЦИСТАТИН С И АЛБУМИНУРИЯ ПРИ ХРОНИЧНИ БЪБРЕЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

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

Научна специалност: Клинична лаборатория

Научен ръководител:

Доцент, д-р Благовеста Дишлянова, дм

София 2014