**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология**

# АНАЛИТИЧНА НАДЕЖДНОСТ НА МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА NGAL, KIM-1 И IL-18 В УРИНА И КЛИНИЧНОТО ИМ ЗНАЧЕНИЕ ЗА РАННА ОЦЕНКА НА РИСКА ОТ РАЗВИТИЕ НА ОСТРО БЪБРЕЧНО УВРЕЖДАНЕ

**Д-р Жулиета Заркова Христова-Димитрова**

## АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор"**

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

**Научен ръководител:**
**Проф. д-р Камен Николаев Цачев, дн**

**Официални рецензенти:**
**Доц. д-р Лиляна Ламбрева, дм**
**Доц. д-р Аделаида Русева, дм**

**София**
**2015**

Дисертационният труд съдържа общо 150 стандартни машинописни страници и е онагледен с 21 таблици и 36 фигури

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

Проучването се базира на общо 314 лица, от които 80 клинично здрави, 160 пациенти, подложени на планова сърдечна операция под екстракорпорално кръвообращение, включваща кардиопулмонален байпас и 74 пациенти, постъпващи в спешно отделение с различни патологични състояния

Докторантът работи като асистент в катедрата по Клинична лаборатория и клинична имунология при Медицински факултет на Медицински университет – София и лекар в Централна клинична лаборатория при УМБАЛ „Александровска“ ЕАД

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание на Научно жури на 28.01.2016 г. от 14:30 часа в аудиторията на Клиниката по нервни болести при УМБАЛ „Александровска“ ЕАД

**Научно жури**

**Председател:**
Доц. д-р Лиляна Ламбрева, дм

**Членове:**
Проф. д-р Камен Цачев, дн
Проф. д-р Елена Цветанова, дн
Проф. д-р Красимира Икономова, дн
Доц. д-р Аделаида Русева, дм

Материалите по защитата са на разположение в секретариата на Катедрата по клинична лаборатория и клинична имунология, МФ, МУ-София, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, ул. „Г. Софийски“ №1.

## СЪДЪРЖАНИЕ

**УВОД ..... 7**

**ЦЕЛ ..... 8**

**ЗАДАЧИ ..... 8**

**МАТЕРИАЛ ..... 9**

**МЕТОДИ ..... 10**

**РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ ..... 19**

**ИЗВОДИ ..... 58**

**ПРИНОСИ ..... 60**

**НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ..... 61**

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ЕКК- Екстракорпорално кръвообращение
КПБ- Кардиопулмонален байпас
ОБН- Остра бъбречна недостатъчност
ОБУ- Остро бъбречно увреждане
ОДСН- Остра декомпенсирана сърдечна недостатъчност
ОМИ- Остър миокарден инфаркт
ХБЗ- Хронично бъбречно заболяване
ACS- Abdominal compartment syndrome
AKIN- Acute Kidney Injury Network
ATP- Adenosine triphosphate
CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute
Creat/Cr- Creatinine
CV- Coefficient of variation
DAMPs- Damage-associated molecular patterns
EMEA- European Medicines Evaluation Agency
ESPMT- N-ethyl-N-sulphopropyl-m-toluidine
FDA- Food and Drug Administration
GFR- Glomerular filtration
HES- Hydroxyethyl starch (хидроксиетил скорбяла)
ICNARC- Intensive Care National Adult Research Centre
IFCC- International Federation of Clinical Chemistry
IL-6- Interleukin-6
IL-18- Interleukin-18
KDIGO- Kidney Disease Improving Global Outcomes
KIM-1- Kidney injury molecule-1
LLOQ- Low limit of quantification
MDRD- Modification of Diet in Renal Disease
NCEPOD- National Confidential Enquiry into Patient Outcome and Death
NF-kB- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGAL- Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NO- Nitrogen oxide
RAAS- Renin-angiotensin-aldosterone system
SD- Standard deviation
SIRS- Systemic Inflammatory response Syndrome

TLR 4- Toll-like receptor 4
TLS- Tumor lysis syndrome
TNF-α- Tumor necrosis factor alpha
ULOQ- Upper limit of quantification

# УВОД

Острото бъбречно увреждане (ОБУ) е често срещано сериозно състояние, което засяга изключително хетерогенна пациентска популация. През последните години понятието ОБУ измести острата бъбречна недостатъчност (ОБН), което разширява спектъра на увредата от по-лека форма до напреднало заболяване, изискващо бъбречно-заместителна терапия. По данни от литературата, в глобален мащаб са засегнати 5 - 7 % от всички хоспитализирани пациенти. Смъртността вследствие ОБУ е около 25% като независим фактор и достига 80% в контекста на мултиорганна недостатъчност.

Обикновено ОБУ се диагностицира въз основа натрупването на крайни продукти от азотната обмяна, какъвто е серумният креатинин. За съжаление серумният креатинин не е достатъчно надежден показател за ранно диагностициране на ОБУ, тъй като стойностите му се влияят от редица извънренални променливи, а клинично значимите промени в нивото му следват с 1 – 3 дни първоначалната структурна увреда. Този период е критичен в диагностично и терапевтично отношение и е предпоставка за повишен риск от неблагоприятен клиничен изход. Като се имат предвид ограниченията на серумния креатинин, търсенето на по-надеждни биомаркери за ОБУ е от особен интерес за съвременната медицина.

С откриването, тълкуването и валидирането на неутрофилния гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) се разкриват нови възможности за търсене на нов подход за оценка на бъбречната функция при ОБУ. NGAL се оказва отличен самостоятелен биомаркер в плазмата и в урината както в диагностично, така и в прогностично отношение. Нови възможности за оценка на ОБУ се разкриват и с определянето на молекула за бъбречно увреждане-1 (KIM-1) и интерлевкин-18 (IL-18).

## ЦЕЛ

Да се определи аналитичната надеждност на методите за изследване на NGAL, KIM-1 и IL-18 в урина и тяхното клинично значение за ранна оценка на риска от развитие на остро бъбречно увреждане при различни патологични състояния.

## ЗАДАЧИ

1. Въвеждане на ELISA тип сандвич метод за определяне на NGAL, KIM-1 и IL-18 в урина.

2. Верифициране на ELISA тип сандвич метод за определяне на NGAL, KIM-1 и IL-18 в урина.

3. Определяне на референтни граници за българската популация за NGAL, KIM-1 и IL-18 в урина.

4. Представяне на получените резултати за NGAL, KIM-1 и IL-18 в урина като съотношения спрямо уринния креатинин и определяне на референтни граници за изчислените съотношения.

5. Определяне на клиничната приложимост на новите структурни показатели, измерени в урина, при пациенти, подложени на планова сърдечна операция, включваща кардиопулмонален байпас.

6. Определяне на клиничната приложимост на новите структурни показатели, измерени в урина, при пациенти, постъпващи в спешно отделение с различни клинични прояви.

## МАТЕРИАЛ

1. За въвеждането и верифицирането на методите, както и за определяне на референтни интервали на NGAL, KIM-1 и IL-18 в урина за българската популация, в периода 2013 – 2014 г. беше взет биологичен материал- серум и прясна урина, от 80 здрави контроли (40 мъже и 40 жени), българи, на възраст между 21 и 47 години.

Преди вземането на биологичния материал доброволците попълваха предварително изготвен формуляр за уточняване на възрастта, анамнестични данни във връзка със съпътстващи хронични заболявания, които биха могли да повлияят бъбречната функция, изключване на медикаменти с установено нефротоксично действие. Всеки доброволец попълни информирано съгласие по образец, с което декларира волята си за участие в проучването.

Изключващи критерии: възраст под 18 г., бременност, анамнеза за хронично бъбречно заболяване или друго системно заболяване с потенциален риск от вторично бъбречно засягане, прием на медикаменти с установено нефротоксично действие.

2. За клиничното проучване беше взет биологичен материал- серум и урина по предварително стандартизирани критерии, от 2 групи пациенти:

2.1. Пациенти, подложени на планова сърдечна операция, включваща кардиопулмонален байпас (n=160)

На пациентите от тази група беше взета урина от уринаторната торбичка между втория и шестия час след съдовата анастомоза за определяне на NGAL, KIM-1, IL-18 и креатинин в урина. На 48-ия час след хирургичната интервенция беше взета венозна кръв и отделен серум за определяне на серумен креатинин.

2.2. Пациенти, постъпващи в спешно отделение, с различни клинични прояви (n=74)

На пациентите от тази група беше взета урина от първата порция след постъпване в отделението или от уринаторната торбичка при тези, при които беше извършено трансуретрално катетризиране, за

определяне на NGAL, KIM-1, IL-18 и креатинин в урина. На 48-ия час след приема в отделението беше взета венозна кръв и отделен серум за определяне на серумен креатинин.

## МЕТОДИ

1. Стандартизиране на условията за взимане на биологичен материал при здравите контроли

За определяне на състоянието на бъбречно здраве бяха изследвани уринен и серумен креатинин с ензимен метод на всеки отделен индивид с помощта на биохимичен анализатор Abbott Architect ci4100, въз основа на което беше изчислена гломерулната филтрация (GFR) по MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) формулата, където GFR = 186 x $(S_{Creat})^{-1.154}$ x (Възраст)$^{-0.203}$ x (0.742 за женски пол) (mL/min/1.73m$^2$).

Кръвта беше взета при стандартизирани условия- сутрин между 7:30 и 9:00 ч., на гладно (след 12-часова хранителна пауза) от кубиталната вена във вакутейнер, съдържащ сепариращ гел. След престой от 30 мин. на стайна температура за ретракция на съсирека, вакутейнерите бяха центрофугирани за 10 мин. при 2200g за отделяне на серум. С помощта на пипета с пластмасов накрайник за еднократно ползване, серумът беше прехвърлен във вторична полипропиленова епруветка тип Eppendorf®, надлежно идентифицирана, при стриктно спазване на изискванията да няма серуми с хемолиза, липемия или иктер, което би могло да компрометира резултатите. Материалите бяха съхранявани при -20◦C до извършване на анализа.

За определяне на креатинин, NGAL, KIM-1 и IL-18 в урина беше взета еднократна порция първа сутрешна урина в количество 50 mL. Урината беше прехвърлена в полипропиленова епруветка с конусовидно дъно и центрофугирана за 20 мин. при 1000g. От надстоящата течност бяха прехвърлени по 1 mL в 4 идентифицирани вторични полипропиленови епруветки тип Eppendorf®. Материалите бяха съхранявани при -20◦C до извършване на анализа.

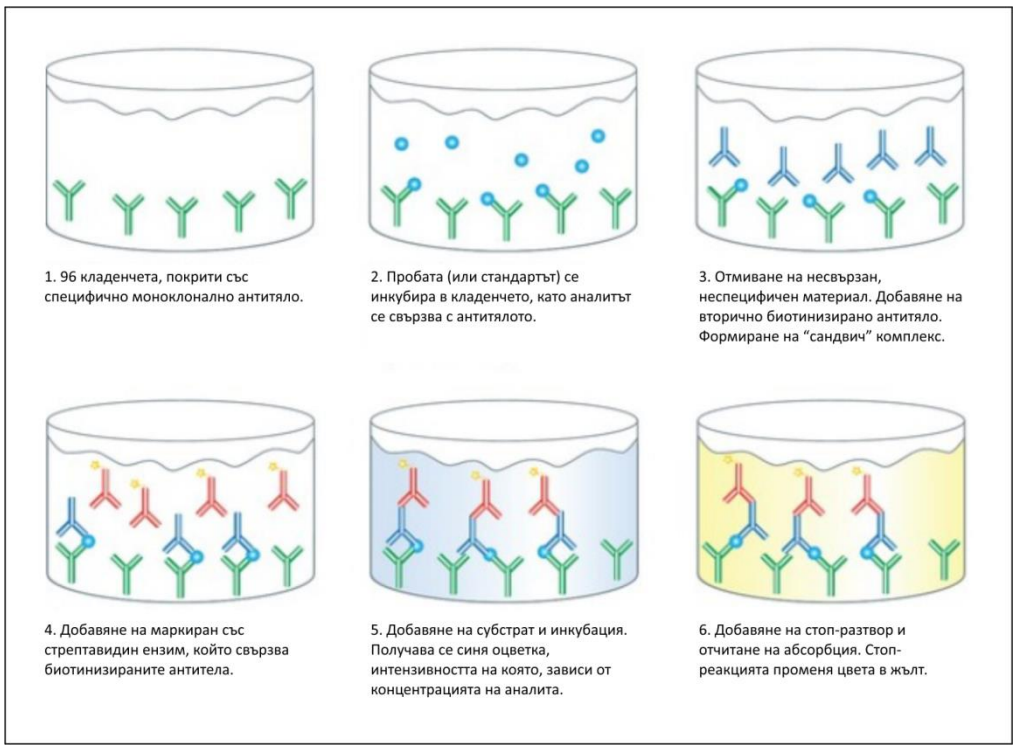
2. Стандартизиране на условията за взимане на биологичен материал при пациентските групи

2.1. От пациентите, подложени на планова оперативна интервенция- кардиопулмонален байпас, беше взета урина от уринаторната торбичка в количество 20 – 50 mL на 6-ия час след съдовата анастомоза. Урината беше прехвърлена в полипропиленови епруветки и центрофугирана за 20 мин. при 1000g. От надстоящата течност бяха прехвърлени по 1 mL в 4 идентифицирани вторични полипропиленови епруветки тип Eppendorf®. Материалите бяха съхранявани при -20◦C до извършване на анализа.

На 48-ия час след съдовата анастомоза на всеки пациент беше взета кръв от кубиталната вена във вакутейнер, съдържащ сепариращ гел. След престой от 30 мин. на стайна температура за ретракция на съсирека, вакутейнерите бяха центрофугирани за 10 мин. при 2200g за отделяне на серум. С помощта на пипета с пластмасов накрайник за еднократно ползване, серумът беше прехвърлен във вторична полипропиленова епруветка тип Eppendorf®, надлежно идентифицирана, при стриктно спазване на изискванията да няма серуми с хемолиза, липемия или иктер, което би могло да компрометира резултатите. Материалите бяха съхранявани при -20◦C до извършване на анализа.

2.2. При групата пациенти, постъпващи в спешно отделение с различна патологични състояния, беше взета първата спонтанно отделена порция урина или от уринаторната торбичка, при тези при които се наложи трансуретрално катетризиране (на втория час след постъпването). Урината беше прехвърлена в полипропиленова епруветка с конусовидно дъно и центрофугирана за 20 мин. при 1000g. От надстоящата течност бяха прехвърлени по 1 mL в 4 идентифицирани вторични полипропиленови епруветки тип Eppendorf®. Материалите бяха съхранявани при -20◦C до извършване на анализа.

За определяне на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 е използван ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) тип „сандвич“.




Фигура 1. Схематичен модел на ELISA тип „сандвич".
*(2015 EMD Millipore Corporation©).*

3. Ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) за количествено определяне на Human Lipocalin-2/NGAL в урина (BioVendor):

Реагенти:

- Antibody Coated Microtiter Strips
- Biotin Labelled Antibody Conc. (20x)
- Streptavidin-HRP Conjugate
- Master Standard
- Quality Control H
- Quality Control L
- Dilution Buffer
- Biotin-Ab Diluent
- Wash Solution Conc. (10x)
- Substrate Solution
- Stop Solution

Уринните проби бяха съхранявани при -20◦C, съгласно изискванията на производителя на ELISA кита. Преди анализа бяха

размразени до стайна температура. Уринните проби бяха разредени с разреждащия буфер в съотношение 1:10, в съответствие с препоръките в методиката, като след това резултатите бяха умножени по разреждащия фактор (10). За построяването на калибрационната крива в шест чисти стъклени виалки бяха приготвени падащи разредки от първичния стандарт с концентрация 10 ng/mL, както следва:

1. 10 ng/mL
2. 5 ng/mL
3. 2.5 ng/mL
4. 1.25 ng/mL
5. 0.6 ng/mL
6. 0.3 ng/mL

В покритите с антитела кладенчета бяха пипетирани по 100 µL от стандартните разтвори (A1+2, B1+2, C 1+2, D1+2, E1+2, F1+2), контролите (G1+2 и H1+2). В останалите кладенчета бяха апликирани предварително разредените, съгласно указанията на производителя, уринни проби. Плаката беше покрита с непрозрачно фолио и инкубирана за един час на стайна температура в орбитален шейкър при 300 rpm. С помощта на автоматично миещо устройство беше извършено прецизно отпипетиране на кладенчетата, последвано от трикратно промиване с 350 µL миещ разтвор. В края на процедурата плаката беше внимателно обърната върху дебела филтърна хартия, за да бъде отстранена цялата остатъчна течност. С помощта на автоматична пипета във всяко кладенче бяха добавени по 100 µL разтвор, съдържащ маркирани с биотин антитела. Последва повторна инкубация за единчас на стайна температура при 300 rpm. Кладенчетата бяха отново трикратно промити с 350 µL миещ разтвор. Във всяко кладенче беше пипетиран по 100 µL Стрептавидин-HRP конюгат с последваща инкубация за 30 минути на стайна температура при 300 rpm и финално трикратно промиване на плаката с 350 µL миещ разтвор във всяко кладенче. С помощта на автоматична пипета бяха добавени по 100 µL субстрат във всяко кладенче с последваща инкубация в тъмна камера на стайна температура за 10 минути, след което цветната реакция беше стопирана чрез добавяне на 100 µL Стоп разтвор във всяко кладенче. Абсорбцията

беше отчетена при 450 nm и корекция при 630 nm с помощта на ELISA отчитащо устройство. Концентрациите бяха изчислени на базата на калибрационната крива в ng/mL.

За верифицирането на уринен NGAL ELISA тип сандвич бяха определени аналитичен обхват на метода, възпроизводимост в серия, възпроизводимост между серии, достоверност, аналитична откриваемост и бяха определени референтни граници за българската популация. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистически програмен софтуеър SPSS 19.0 на IBM и RefVal на IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

4. Ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) за количествено определяне на Human KIM-1 в урина (BioAssay Works®):

Реагенти:

- Human KIM-1 antibody-coated plate
- Human Kim-1 Calibrator/Control rehydration/formulation buffer
- Human Kim-1 Positive Antigen-Control Urine
- Human Kim-1 Negative Antigen-Control Urine
- Human Kim-1 20 ng/mL Calibrator
- Human Peroxide-Anti-KIM-1 Conjugate Solution
- Sample Dilution Buffer
- Human KIM-1 Plate Stabilizer
- ABTS Substrate Solution
- Stop Solution
- Wash Solution

Уринните проби бяха взети, прехвърлени във вторични епруветки тио Eppendorf© и съхранявани при -20◦C. Преди анализа бяха размразени до стайна температура. Уринните проби бяха разредени с разреждащия буфер в чисти стъклени епруветки в съотношение 1:3, съгласно указанията на производителя. За построяването на калибрационна крива в шест чисти стъклени епруветки бяха приготвени

падащи разредки от калибратора с концентрация 20 ng/mL, както следва:

1. 10 ng/mL
2. 5 ng/mL
3. 2.5 ng/mL
4. 1.25 ng/mL
5. 0.525 ng/mL
6. 0.313 ng/mL
7. 0 ng/mL

Във всяко кладенче на обработената с антитела плака бяха пипетирани по 50 µL от разреждащия буфер. По 25 µL от стандартните разтвори и контролите бяха апликирани в по две успоредни кладенчета плаката. В останалите кладенчета бяха апликирани предварително разредените, съгласно указанията на производителя, уринни проби. Плаката беше покрита с непрозрачно фолио и оставена за инкубация за 120 минути на стайна температура. С помощта на автоматично миещо устройство беше извършено прецизно отпипетиране на кладенчетата, последвано от четирикратно промиване с 300 µL миещ разтвор. В края на процедурата плаката беше внимателно обърната върху дебела филтърна хартия, за да бъде отстранена цялата остатъчна течност. С помощта на 8-канална автоматична пипета във всяко кладенче бяха добавени по 100 µL от готовия за употреба анти-KIM-1 конюгат. Плаката беше плътно покрита с непрозрачно фолио и оставена за инкубация за 60 минути на стайна температура, след което отново кладенчетата бяха промити четирикратно, както беше описано. С помощта на 8-канална автоматична пипета бяха добавени по 100 µL от субстратния разтвор във всяко кладенче с последваща инкубация за 20 минути на стайна температура. Бяха прибавени по 100 µL Стоп разтвор във всяко кладенче и се пристъпи към отчитане на абсорбцията на пробите при 405 nm дължина на вълната и корекция на абсорбцията при 490 nm с помощта на ELISA отчитащо устройство. Концентрациите бяха изчислени на базата на стандартната крива и изразени в pg/mL.

За верифицирането на уринен KIM-1 ELISA тип сандвич бяха определени аналитичен обхват на метода, възпроизводимост в серия,

възпроизводимост между серии, достоверност, аналитична откриваемост и бяха определени референтни граници за българската популация. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистически програмен софтуеър SPSS 19.0 на IBM и RefVal на IFCC.

5. Ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) за количествено определяне на Human IL-18 в урина (RayBio®):

Реагенти:

- IL-18 Microplate coated with anti-human IL-18
- Wash Buffer Concentrate
- Standard- recombinant human IL-18
- Assay Diluent A: 0.09% sodium azide
- Assay Diluent B: 5x concentrated buffer
- Detection Antibody IL-18: biotinylated anti-human IL-18
- HRP-Streptavidin Concentrate
- TMB One-Step Substrate Reagent
- Stop Solution

Уринните проби бяха взети, прехвърлени във вторични епруветки тип Eppendorf© и съхранявани при -20◦C, съгласно изискванията на производителя. Преди анализа бяха размразени до стайна температура. За построяването на калибрационната крива в осем чисти стъклени виалки бяха приготвени падащи разредки от калибратора с концентрация 75 pg/mL, както следва:

1. 75 pg/mL
2. 30 pg/mL
3. 12 pg/mL
4. 4.8 pg/mL
5. 1.92 pg/mL
6. 0.77 pg/mL
7. 0.22 pg/mL
8. 0 pg/mL

Във всяко кладенче на обработената с антитела плака бяха пипетирани по 100 µL от стандартните разтвори (A-H1+2), контролите (A3, B3) и уринните проби. Плаката беше покрита с фолио и инкубирана за 2.5 часа на стайна температура при 50 rpm. С помощта на автоматично миещо устройство беше извършено прецизно отпипетиране на кладенчетата, последвано от четирикратно промиване с 300 µL миещ буфер. В края на процедурата плаката беше внимателно обърната върху дебела филтърна хартия за отстраняване на цялата остатъчна течност. С автоматична пипета бяха добавени по 100 µL разтвор на маркирани с биотин антитела във всяко кладенче с последваща инкубация за 1 час на стайна температура при 50 rpm. Плаката беше промита четирикратно с миещ буфер. С автоматична пипета бяха апликирани по 100 µL разтвор на стрептавидин във всяко кладенче с последваща инкубация за 45 минути на стайна температура при 50 rpm с последващо четирикратно промиване с миещ буфер. Във всяко кладенче бяха добавени по 100 µL субстрат с последваща инкубация за 30 минути на стайна температура, под непрозрачно фолио и при 50 rpm. Във всяко кладенче бяха добавени по 50 µL Стоп разтвор и се пристъпи към отчитане на абсорбцията при 450 nm дължина на вълната с помощта на ELISA отчитащо устройство. Концентрациите бяха изчислени на базата на калибрационната крива и изразени в pg/mL.

За верифицирането на уринен IL-18 ELISA тип сандвич бяха определени аналитичен обхват на метода, възпроизводимост в серия, възпроизводимост между серии, достоверност, аналитична откриваемост и бяха определени референтни граници за българската популация. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистически програмен софтуеър SPSS 19.0 на IBM и RefVal на IFCC.

6. Нормализиране на получените резултати за NGAL, KIM-1 и IL-18 чрез представянето им като съотношение спрямо креатинин в урина.

7. Ензимен PAP метод за определяне на креатинин в серум и урина с биохимичен анализатор Abbott Architect ci4100.

- хидролиза за креатинина до креатин с помощта на креатининаза (реагент 1)

- хидролиза на креатина до саркозин и урея с помощта на креатиназа

- Окисление на саркозина до глицин, формалдехид и водороден пероксид с помощта на саркозин оксидаза

- Водородният пероксид реагира с 4-аминоантипирин и ESPMT (N-етил-N-сулфопропил-m-толуидин) в присъствието на пероксидаза, за да се получи хинониминово багрило.

- Промяната в абсорбцията при 548 nm е пропорционална на концентрацията на креатинин в пробата.

8. Статистически методи:

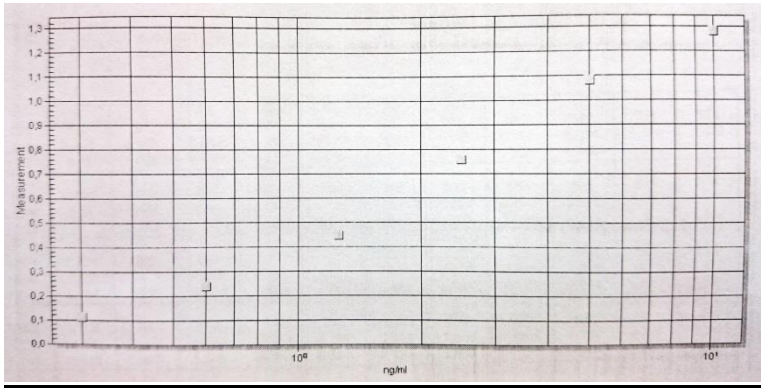
- дескриптивен анализ за представяне на честотното разпределение на различни демографски и клинични характеристики
- вариационен анализ за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическото разсейване
- тест на Колмогоров-Смирнов и Shapiro-Wilk за проверка на разпределението за нормалност
- t-test на Student-Fisher за установяване на статистически значими разлики при категорични променливи
- chi-square test при прието ниво на значимост от 95%
- коефициент на корелация на Pearson за изследване на връзката между две променливи
- Wilcoxon Signed-Ranks Test за сравняване на повтарящи се измервания
- Receiver-Operating Characteristic (ROC) криви и изчислени Area Under the Curve (AUC) за оценка на чувствителността и специфичността на лабораторните показатели
- множествен регресионен анализ за оценка на функционалните зависимости между лабораторните показатели и други демографски и клинични параметри
- криви на Kaplan-Meier за оценка на емпиричната експоненциална зависимост между преживяемостта и следоперативния период при пациенти, развили остро бъбречно увреждане

## РЕЗУЛТАТИ

Когато се работи с готови диагностични набори, определянето на аналитичната надеждност на методите се извършва чрез процедурата верифициране на метода (потвърждаване данните на производителя) съгласно Протокол EP 15 A2 на CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

1. За верифициране на Human Lipocalin-2/NGAL ELISA метод в урина бяха определени аналитичен обхват на метода (линейност), невъзпроизводимост в серия, невъзпроизводимост между серии, достоверност и бяха определени референтни граници. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистически програмен софтуеър SPSS 19.0 на IBM и RefVal на IFCC.

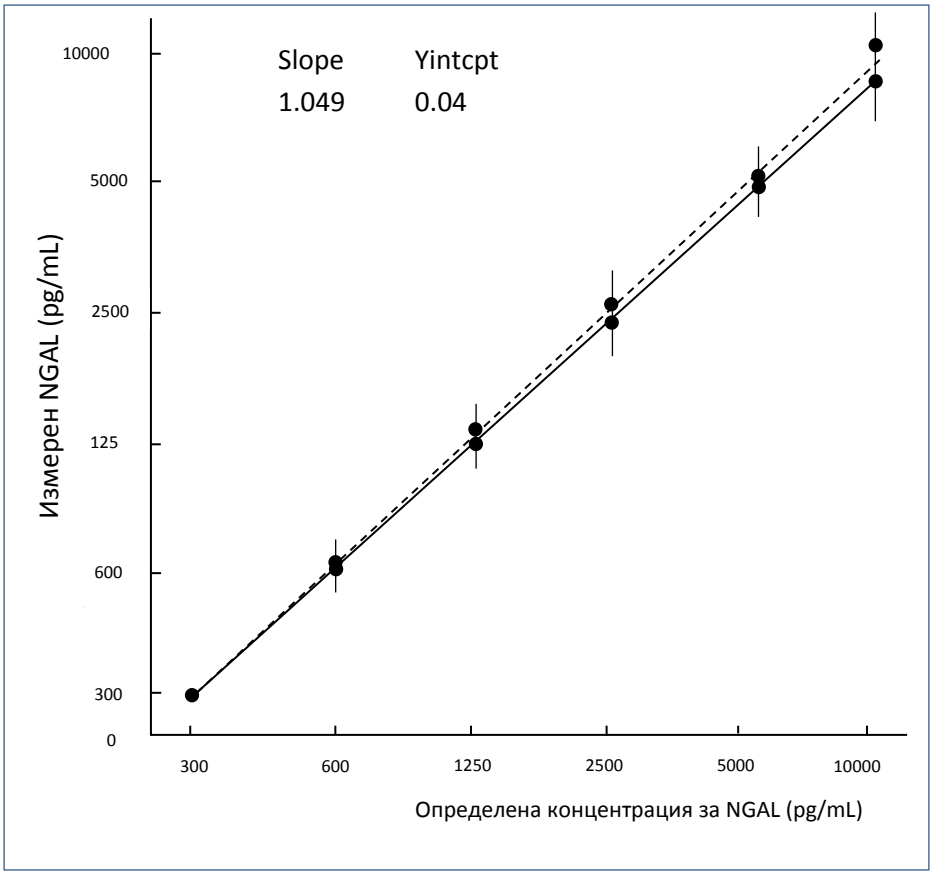
1.1. Аналитичен обхват (линейност): За определяне линейността на метода от стандартен разтвор с висока концентрация и разреждащ разтвор бяха приготвени 6 еквидистантни разредки. Всеки разтвор беше апликиран двойно, построена калибрационна крива и беше изчислено уравнението на линейна регресия. Графиката на линейността показа slope 1.049 и приемлива за клинични цели линейност от 0.3 ng/mL до 9.55 ng/mL. За удължаване на линейния диапазон се прилагат процедури на разреждане от 30 до 100 пъти.




X-Axis: logarithmic
Y-Axis: linear

| St | Conc. | Backfit | Status |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0 | Underflow |
| 2 | 0.3 | 0.302 | OK |
| 3 | 0.6 | 0.628 | OK |
| 4 | 1.25 | 1.222 | OK |
| 5 | 2.5 | 2.475 | OK |
| 6 | 5 | 5.148 | OK |
| 7 | 10 | 9.781 | OK |

Фигура 2. Калибрационна крива от определяне на uNGAL с Human Lipocalin-2/NGAL ELISA метод.




Фигура 3. Линейност на NGAL ELISA тип сандвич, определена чрез пропорционално разреждане на стандарт с висока концентрация.

1.2. Проверка на калибрационната крива

За проверка на калибрационната крива бяха определени LLOQ (Low Limit of Quantification)- долна граница на количествено определяне, както и ULOQ (Upper Limit of Quantification)- горна граница на количествено определяне. С помощта на 5 успоредни проби за LLOQ се получиха $\bar{x}$ 0.32 ng/mL, CV 19.8% и d% 4.46. С помощта на 5 успоредни проби за ULOQ се получиха $\bar{x}$ 9.55ng/mL, CV 13.1% и d% 6.1. Получените резултати са в съответствие с международните изисквания (CV до 20% за LLOQ и до 15% за ULOQ).

1.3. Невъзпроизводимост: Бяха приготвени сборни урини (ниска и висока концентрация) и изследвани на една плака (N = 10) за определяне на невъзпроизводимост в серия. Беше изчислен коефициент на вариация (CV%) в двете концентрационни области. В ниската област отчитанията показаха средна стойност 7.6 ± 0.8 ng/mL (CV = 10.5%, N = 10). Във високата концентрационна област отчитанията

показаха средна стойност 83.5 ± 4.2 ng/mL (CV = 5%, N = 10). За определяне на невъзпроизводимостта между серии същите сборни проби бяха изследвани на една отделна плака. В ниската концентрационна област отчитанията показаха средна стойност 0.72 ± 0.8 ng/mL (CV = 11.1%). Във високата концентрационна област отчитанията показаха средна стойност 81.7 ± 4.0 ng/mL (CV = 4.9%).

Таблица 1. uNGAL- невъзпроизводимост на метода.

| **Проба** | **N** | **Средна (ng/mL)** | **SD** | **CV (%)** |
|---|---|---|---|---|
| Ниска в серия | 10 | 7.6 | 0.8 | 10.5 |
| Висока в серия | 10 | 83.5 | 4.2 | 5.0 |
| Ниска между серии | 2 | 7.2 | 0.8 | 11.1 |
| Висока между серии | 2 | 81.7 | 4.0 | 4.9 |

1.4. Достоверност: За да се определи достоверността, беше използван методът на аналитична откриваемост (%recovery). Бяха отделени 5 проби с измерени концентрации на NGAL между 20 и 32 ng/mL, както и една проба с измерена концентрация 92.3 ng/mL. От тях бяха приготвени 5 сборни проби чрез смесване на 10% от високата проба с 90% от ниските. На база измерените първоначални стойности бяха калкулирани очакваните стойности след добавяне на 10% от високата проба. Беше изчислена средна откриваемост 91.2%.

Таблица 2. uNGAL аналитична откриваемост. Очакваните стойности бяха сравнени с измерените и беше изчислен % аналитична откриваемост (recovery).

| **Проба** | **Измерена концентр. ng/mL** | **Очаквана концентр. ng/mL** | **% аналитична откриваемост** |
|---|---|---|---|
| Висока концентрация | 92.3 | - | - |
| 1 | 20.2 | - | - |
| 2 | 27.2 | - | - |
| 3 | 27.4 | - | - |
| 4 | 30.1 | - | - |
| 5 | 31.5 | - | - |
| 10% висока+90% 1 | 26.1 | 27.4 | 95.3 |
| 10% висока+90% 2 | 31.6 | 33.7 | 93.8 |
| 10% висока+90% 3 | 31.2 | 33.9 | 92.0 |
| 10% висока+90% 4 | 32.0 | 36.3 | 88.2 |
| 10% висока+90% 5 | 32.6 | 37.6 | 86.7 |

Средна аналитична откриваемост: 91.2%

1.5. Референтни граници за uNGAL (ng/mL) за българската популация.

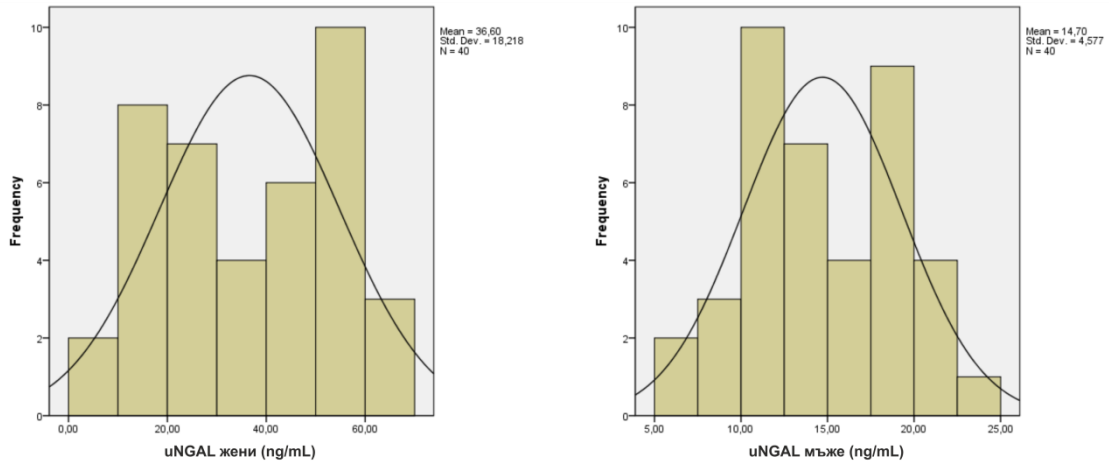
На 80 здрави доброволци (40 мъже и 40 жени) бяха взети кръв и урина и изследвани за серумен и уринен креатинин, както и за NGAL в

урина. Въз основа на серумния креатинин, възрастта, пола и расата на контролните индивиди беше изчислена гломерулната филтрация по MDRD. При всички доброволци GFR беше > 90.0. Получените резултати за NGAL бяха от 6 до 65 ng/mL.

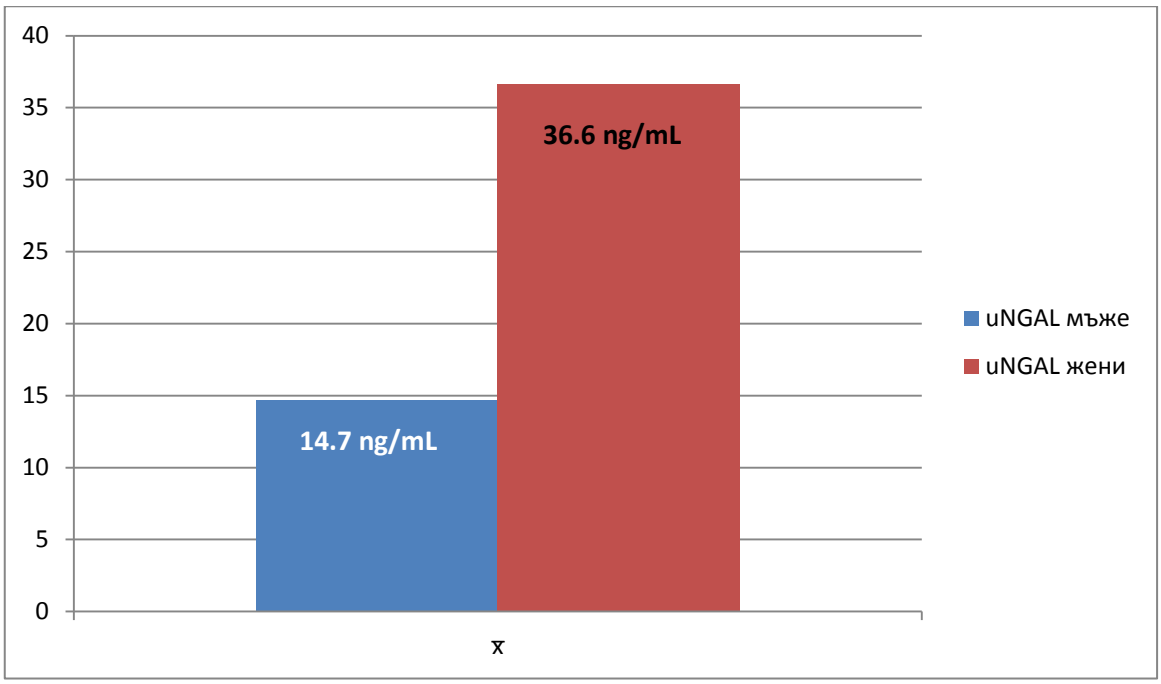
Очертаха се статистически значими разлики между двата пола, поради което доброволците бяха разделени на две групи- мъжки и женски пол. При всяка от групите разпределението на резултатите беше от Гаусов тип и беше приложен параметричен подход за определяне на референтните граници.

При средна стойност ( $\overline{x}$ ) на резултатите на индивидите от женски пол 36.6 ng/mL, стандартно отклонение (SD) 18.22 и нормално разпределение, по формулата $\overline{x}$ ± 2SD (95% доверителен интервал) бяха определени референтните граници за uNGAL за жени в българската популация: 0.16 – 73.04 ng/mL.

При средна стойност ( $\overline{x}$ ) на резултатите на индивидите от мъжки пол 14.7 ng/mL, стандартно отклонение (SD) 4.58 и нормално разпределение, по формулата $\overline{x}$ ± 2SD (95% доверителен интервал) бяха определени референтните граници за uNGAL за мъже в българската популация: 5.54 – 23.86 ng/mL.



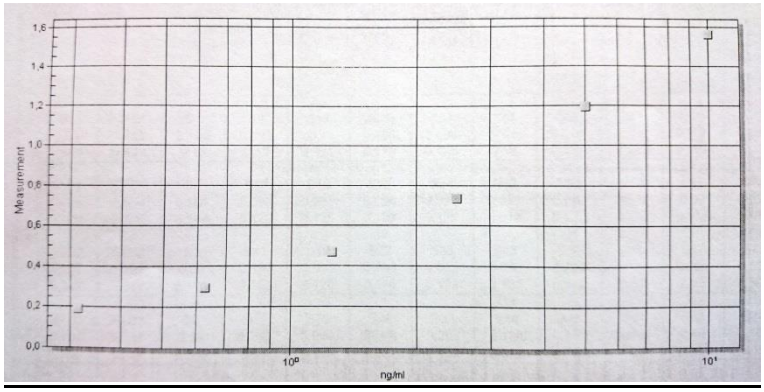

Фигура 4. Разпределение на резултатите за uNGAL при здравите контроли от женски и мъжки пол.




Фигура 5. $\bar{x}$ за uNGAL (ng/mL) при 40 здрави контроли от мъжки пол и 40 здрави контроли от женски пол.

2. За верифициране на Human KIM-1 ELISA в урина бяха определени аналитичен обхват на метода (линейност), невъзпроизводимост в серия, невъзпроизводимост между серии, достоверност и бяха определени референтни граници. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистически програмен софтуеър SPSS 19.0 на IBM и RefVal на IFCC.

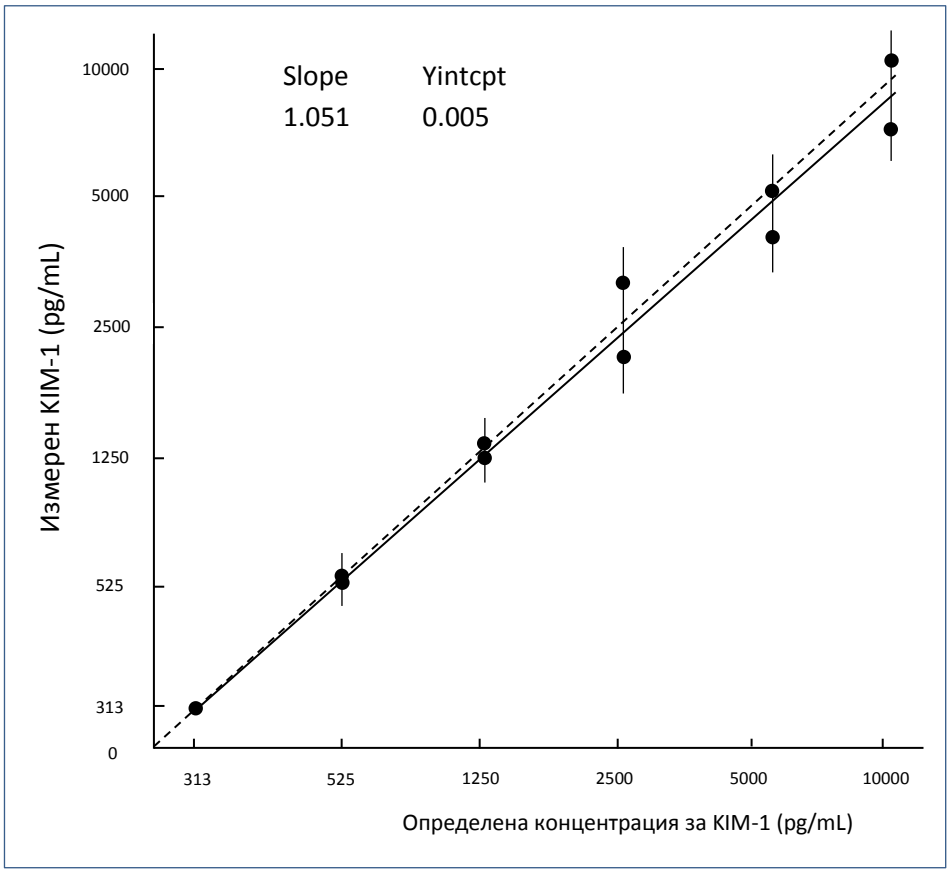
2.1. Аналитичен обхват (линейност): За определяне линейността на метода от стандартен разтвор с висока концентрация и разреждащ разтвор бяха приготвени 6 еквидистантни разредки. Всеки разтвор беше апликиран двойно, построена калибрационна крива и беше изчислено уравнението на линейна регресия. Графиката на линейността показа slope 1.051 и приемлива за клинични цели линейност от 0.31 ng/mL до 9.7 ng/mL. За удължаване на линейния диапазон се прилагат процедури на разреждане от 3 до 100 пъти.




X-Axis: logarithmic
Y-Axis: linear

| St | Conc. | Backfit | Status |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0 | Underflow |
| 2 | 0.313 | 0.371 | OK |
| 3 | 0.625 | 0.66 | OK |
| 4 | 1.25 | 1.209 | OK |
| 5 | 2.5 | 2.32 | OK |
| 6 | 5 | 5.347 | OK |
| 7 | 10 | 9.788 | OK |

Фигура 6. Калибрационна крива от определяне на Human KIM-1 ELISA в урина.




Фигура 7. Линейност на KIM-1 ELISA тип сандвич, определена чрез пропорционално разреждане на стандарт с висока концентрация.

2.2. Проверка на калибрационната крива

За проверка на калибрационната крива бяха определени LLOQ и ULOQ. С помощта на 5 успоредни проби за LLOQ се получиха $\bar{x}$ 0.01 ng/mL, CV 19.5% и d% 8.3. С помощта на 5 успоредни проби за ULOQ се получиха $\bar{x}$ 9.7 ng/mL, CV 13.7 и d% 1.58. Получените резултати са в

съответствие с международните изисквания (CV до 20% за LLOQ и до 15% за ULOQ).

2.3. Невъзпроизводимост: Бяха приготвени сборни урини (ниска и висока концентрация) и изследвани на една плака (N = 10) за определяне на невъзпроизводимост в серия. Беше изчислен коефициент на вариация (CV%) в двете концентрационни области. В ниската област отчитанията показаха средна стойност 383.5 ± 16.4 pg/mL (CV = 4.2%, N = 10). Във високата концентрационна област отчитанията показаха средна стойност 2034 ± 108 pg/mL (CV = 5.3%, N = 10). За определяне на невъзпроизводимостта между отделни серии същите сборни проби бяха изследвани на една отделна плака. В ниската концентрационна област отчитанията показаха средна стойност 386 ± 17.9 pg/mL (CV = 4.6%). Във високата концентрационна област отчитанията показаха средна стойност 2005 ± 96 pg/mL (CV = 4.8%).

Таблица 3. uKIM-1 невъзпроизводимост на метода.

| **Проба** | **N** | **Средна (pg/mL)** | **SD** | **CV (%)** |
|---|---|---|---|---|
| Ниска в серия | 10 | 383.5 | 16.4 | 4.2 |
| Висока в серия | 10 | 2034 | 108 | 5.3 |
| Ниска между серии | 2 | 386 | 17.9 | 4.6 |
| Висока между серии | 2 | 2005 | 96 | 4.8 |

2.4. Достоверност: За да се определи достоверността, беше използван методът на аналитична откриваемост (%recovery). Бяха отделени 5 проби с измерени концентрации на KIM-1 между 350 и 450 pg/mL, както и една проба с измерена концентрация 1536 pg/mL. От тях бяха приготвени 5 сборни проби чрез смесване на 10% от високата проба с 90% от ниските.

На база измерените първоначални стойности, бяха калкулирани очакваните стойности след добавяне на 10% от високата проба. Беше изчислена средна откриваемост 96.2%.

Таблица 4. uKIM-1 аналитична откриваемост. Очакваните стойности бяха сравнени с измерените и беше изчислен % аналитична откриваемост (recovery).

| | **Измерена концентр. pg/mL** | **Очаквана концентр. pg/mL** | **% аналитична откриваемост** |
|---|---|---|---|
| Висока концентрация | 1563 | - | - |
| 1 | 355 | - | - |
| 2 | 378 | - | - |
| 3 | 390 | - | - |
| 4 | 416 | - | - |
| 5 | 450 | - | - |
| 10% висока+90% 1 | 492 | 476 | 104.0 |
| 10% висока+90% 2 | 485 | 497 | 97.6 |
| 10% висока+90% 3 | 490 | 507 | 96.6 |
| 10% висока+90% 4 | 495 | 531 | 93.2 |
| 10% висока+90% 5 | 502 | 561 | 89.5 |

Средна аналитична откриваемост: 96.2%

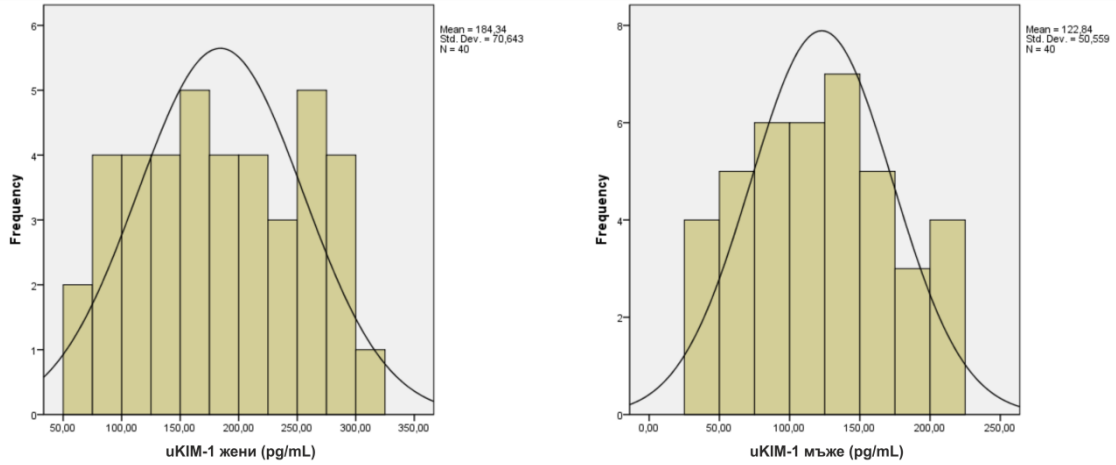
2.5. Референтни граници за uKIM-1 (pg/mL) за българската популация.

На 80 здрави доброволци (40 мъже и 40 жени) бяха взети кръв и урина и изследвани за серумен и уринен креатинин, както и за KIM-1 в урина. Въз основа на серумния креатинин, възрастта, пола и расата на контролните индивиди беше изчислена гломерулната филтрация по MDRD. При всички доброволци GFR беше > 90.0. Получените резултати за KIM-1 бяха от 25 - 317 pg/mL.

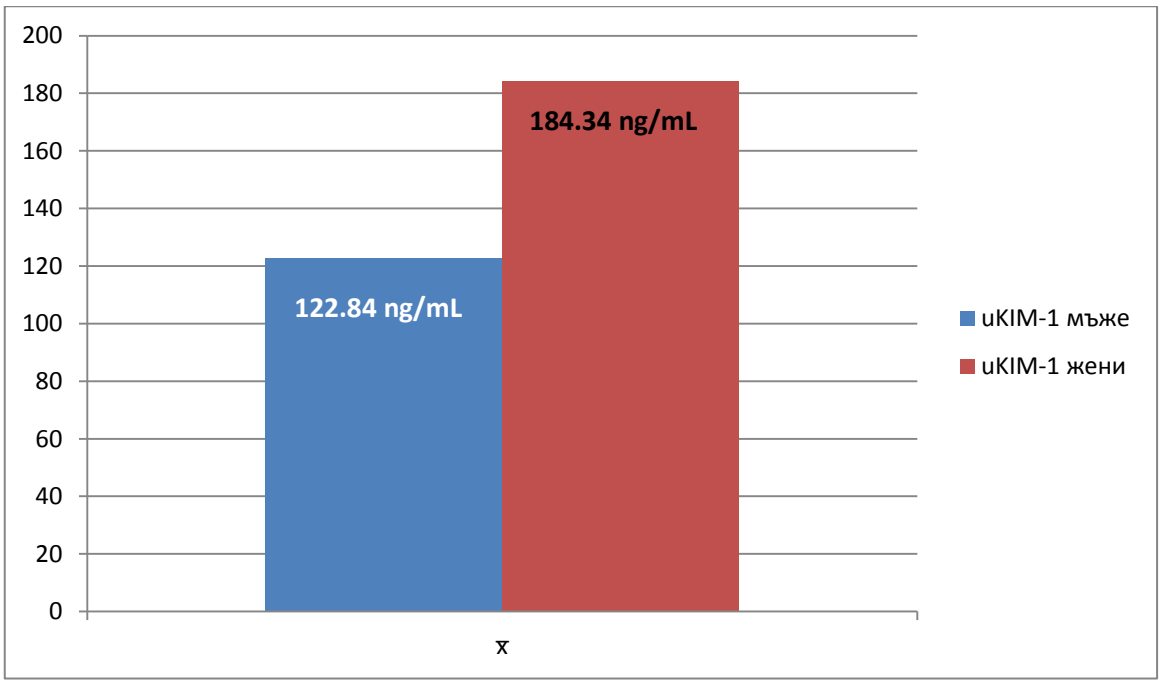
Очертаха се статистически значими разлики между двата пола, поради което доброволците бяха разделени на две групи - мъжки и женски пол. При всяка от групите разпределението на резултатите беше от Гаусов тип и беше приложен параметричен подход за определяне на референтните граници.

При средна стойност ( $\overline{x}$ ) на резултатите на индивидите от женски пол 184.34 pg/mL, стандартно отклонение (SD) 70.64 и нормално разпределение, по формулата $\overline{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал) бяха определени референтни граници за uKIM-1 за жени в българската популация: 43.06 – 325.62 pg/mL.

При средна стойност ( $\overline{x}$ ) на резултатите на индивидите от мъжки пол 122.84 pg/mL, стандартно отклонение (SD) 50.56 и нормално разпределение, по формулата $\overline{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал) бяха определени референтни граници за uKIM-1 за мъже в българската популация: 21.72 – 223.96 pg/mL.



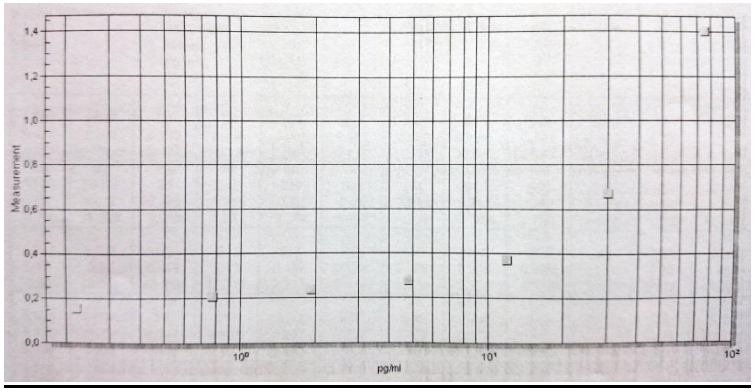

Фигура 8. Разпределение на резултатите за uKIM-1 при здравите контроли от женски и мъжки пол.




Фигура 9. $\bar{x}$ за uKIM-1 (pg/mL) при 40 здрави контроли от мъжки пол и 40 здрави контроли от женски пол.

3. За верифицирането на Human IL-18 ELISA в урина бяха определени аналитичен обхват на метода (линейност), невъзпроизводимост в серия, невъзпроизводимост между серии, достоверност и бяха определени референтни граници. Обработката на данните беше извършена с помощта на статистически програмен софтуеър SPSS 19.0 на IBM и RefVal на IFCC.

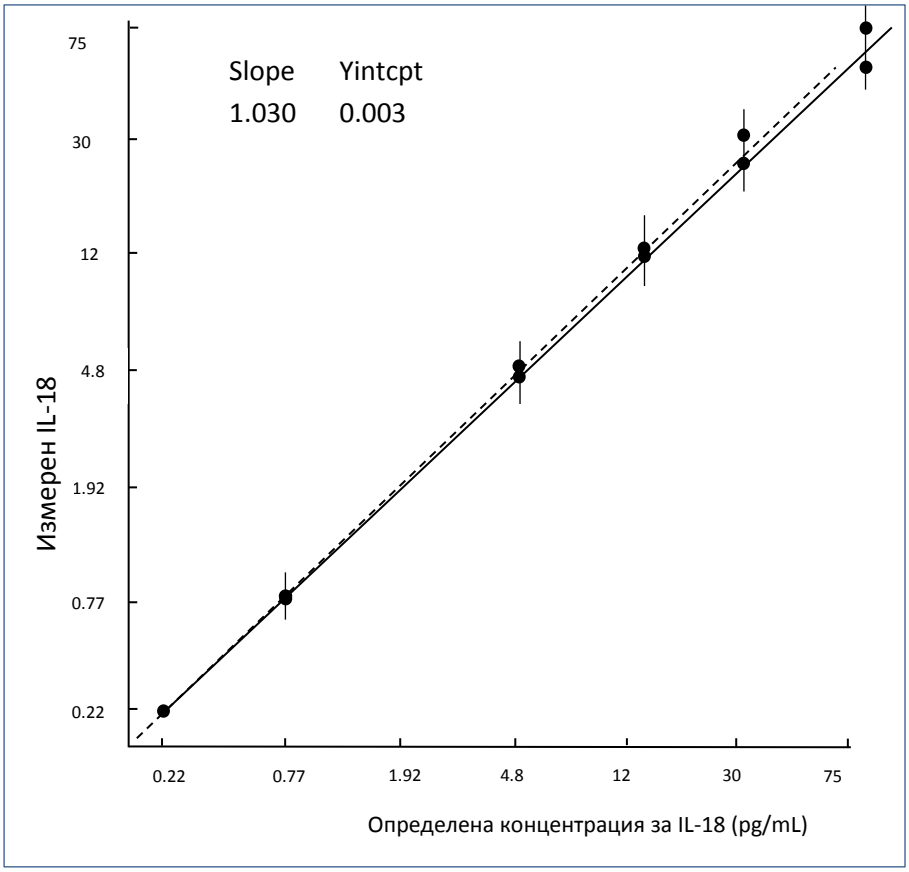
3.1. Аналитичен обхват (линейност): За определяне линейността на метода от калибратор с висока концентрация и разреждащ разтвор бяха приготвени 6 еквидистантни разредки. Всеки разтвор беше апликиран двойно, построена калибрационна крива и беше изчислено уравнението на линейна регресия. Графиката на линейността показа slope 1.030 и приемлива за клинични цели линейност от 0.22 ng/mL до 74.4 pg/mL. За удължаване на линейния диапазон се прилагат процедури на разреждане от 5 до 100 пъти.




X-Axis: logarithmic
Y-Axis: linear

| St | Conc. | Backfit | Status |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0 | Underflow |
| 2 | 0.22 | 0.235 | OK |
| 3 | 0.77 | 0.791 | OK |
| 4 | 1.92 | 2.13 | OK |
| 5 | 4.8 | 4.85 | OK |
| 6 | 12 | 10.961 | OK |
| 7 | 30 | 28.982 | OK |
| 8 | 75 | 75 | OK |

Фигура 10. Калибрационна крива от определянето на Human IL-18 ELISA в урина




Фигура 11. Линейност на IL-18 ELISA тип сандвич, определена чрез пропорционално разреждане на стандарт с висока концентрация.

3.2 Проверка на калибрационната крива

За проверка на калибрационната крива бяха определени LLOQ и ULOQ. С помощта на 5 успоредни проби за LLOQ се получиха $\bar{x}$ 0.072 pg/mL, CV 19.1% и d% 5.6. С помощта на 5 успоредни проби за ULOQ се получиха $\bar{x}$ 74.4 pg/mL, CV 14.1% и d% 5.4. Получените резултати са в

съответствие с международните изисквания (CV до 20% за LLOQ и до 15% за ULOQ).

3.3. Невъзпроизводимост: Бяха приготвени сборни урини (ниска и висока концентрация) и изследвани на една плака (N = 10) за определяне на невъзпроизводимост в серия. Беше изчислен коефициент на вариация (CV%) в двете концентрационни области.

В ниската област отчитанията показаха средна стойност 6.9 ± 0.4 pg/mL (CV = 5.8%, N = 10). Във високата концентрационна област отчитанията показаха средна стойност 48.3 ± 2.3 pg/mL (CV = 4.8%, N = 10). За определяне на възпроизводимостта между серии същите сборни проби бяха изследвани на една отделна плака. В ниската концентрационна област отчитанията показаха средна стойност 6.7 ± 0.4 pg/mL (CV = 6%). Във високата концентрационна област отчитанията показаха 45.9 ± 2.2 pg/mL (CV = 4.8 %).

Таблица 5. uIL-18 невъзпроизводимост на метода.

| **Проба** | **N** | **Средна (pg/mL)** | **SD** | **CV (%)** |
|---|---|---|---|---|
| Ниска в серия | 10 | 6.9 | 0.4 | 5.8 |
| Висока в серия | 10 | 48.3 | 2.3 | 4.8 |
| Ниска между серии | 2 | 6.7 | 0.4 | 6.0 |
| Висока между серии | 2 | 45.9 | 2.2 | 4.8 |

3.4. Достоверност: За да се определи достоверността, беше използван методът на аналитична откриваемост (%recovery). Бяха отделени 5 проби с измерени концентрации за IL-18 между 5.9 и 11.3 pg/mL, както и една проба с измерена концентрация 25.9 pg/mL. От тях бяха приготвени 5 сборни проби чрез смесване на 10% от високата проба с 90% от ниските.

На база измерените първоначални стойности, бяха изчислени очакваните стойности след добавяне на 10% от високата проба. Беше изчислена средна откриваемост 93.1%.

Таблица 6. uIL-18 аналитична откриваемост. Очакваните стойности бяха сравнени с измерените и беше изчислен % аналитична откриваемост (recovery).

| **Проба** | **Измерена концентр. pg/mL** | **Очаквана концентр. pg/mL** | **% аналитична откриваемост** |
|---|---|---|---|
| Висока концентрация | 25.9 | - | - |
| 1 | 5.9 | - | - |
| 2 | 6.8 | - | - |
| 3 | 7.8 | - | - |
| 4 | 9.5 | - | - |
| 5 | 11.3 | - | - |
| 10% висока+90% 1 | 7.2 | 7.9 | 91.1 |
| 10% висока+90% 2 | 8.1 | 8.7 | 93.1 |
| 10% висока+90% 3 | 9.4 | 9.6 | 97.9 |
| 10% висока+90% 4 | 10.3 | 11.1 | 92.8 |
| 10% висока+90% 5 | 11.6 | 12.8 | 90.6 |

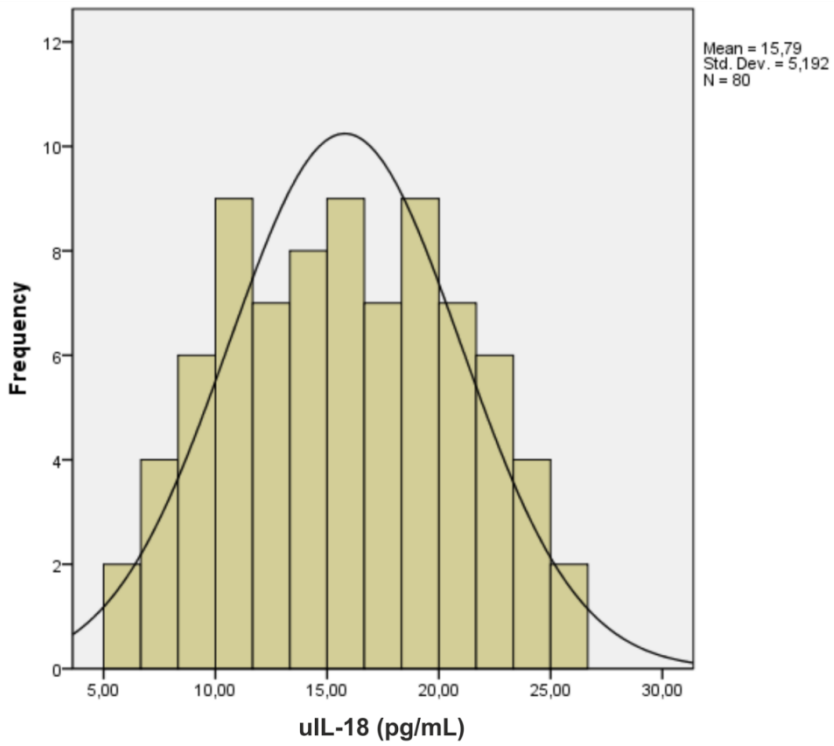
Средна аналитична откриваемост: 93.1%

3.5. Референтни граници за uIL-18 (pg/mL) за българската популация.

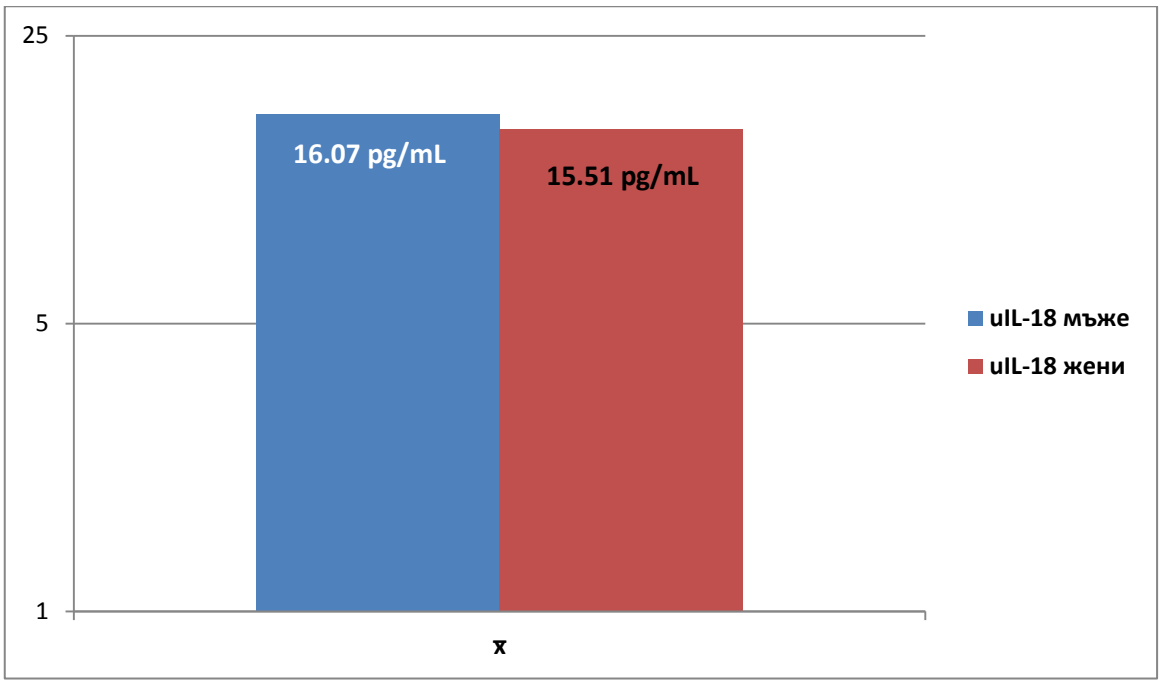
На 80 здрави доброволци (40 мъже и 40 жени) бяха взети кръв и урина и изследвани за серумен и уринен креатинин, както и за IL-18 в урина. Въз основа на серумния креатинин, възрастта, пола и расата на контролните индивиди беше изчислена гломерулната филтрация по MDRD. При всички доброволци GFR беше > 90.0. Получените резултати за IL-18 бяха от 6 - 25 pg/mL. Резултатите за IL-18 в урина не показаха статистически значими разлики между двата пола. Разпределението на

резултатите беше нормално и беше приложен параметричен подход за установяване на референтните граници.

При средна стойност ( $\overline{x}$ ) на резултатите на всички здрави доброволци 15.79 pg/mL, стандартно отклонение (SD) 5.19 и нормално разпределение, по формулата $\overline{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал) бяха определени референтни граници за IL-18 в урина за българската популация: 5.41 – 26.17 pg/mL.




Фигура 12. Разпределение на резултатите за uIL-18 при здравите контроли от двата пола.




Фигура 13. $\bar{x}$ за uIL-18 (pg/mL) при 40 здрави контроли от мъжки пол и 40 здрави контроли от женски пол.

**ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ЗА uNGAL, uKIM-1 И uIL-18 КАТО СЪОТНОШЕНИЯ СПРЯМО uCreat**

Все още няма консенсус по отношение на това дали резултатите на структурните показатели за ОБУ да бъдат представяни като абсолютна стойност или като съотношение спрямо уринния креатинин.

С цел по-добра сравнимост на резултатите представихме получените стойности като съотношения спрямо уринния креатинин. От друга страна абсолютните стойности са показателни при стандартизирани условия за взимане на биологичен материал, което е невъзможно при някои пациентски ситуации, например пациенти, постъпващи в спешно отделение. В тези случаи липсва предварителна подготовка на пациента, а биологичният материал за изследване е случайна порция урина. Преставянето на резултатите като съотношения цели компенсиране на вариациите при инстантните проби.

След нормализиране на резултатите и представянето им като съотношение спрямо креатинина в урина, при uNGAL/uCreat се запази статистически значимата разлика между двата пола, подобно на тази при абсолютните стойности. Това наложи разделяне на здравите доброволци в две групи - женски и мъжки пол. Резултатите на двете групи показаха нормално разпределение.

По формулата $\bar{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал), при $\bar{x} = 21.44$ и SD 10.68 бяха определени референтни граници за uNGAL/uCreat при жени за българската популация 0.08 – 42.8 ng/mg.

При здравите доброволци от мъжки пол изчислената $\bar{x}$ беше 12.98, SD 3.87 и по формулата $\bar{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал) бяха определени референтни граници за uNGAL/uCreat при мъже за българската популация 5.24 – 20.72 ng/mg.

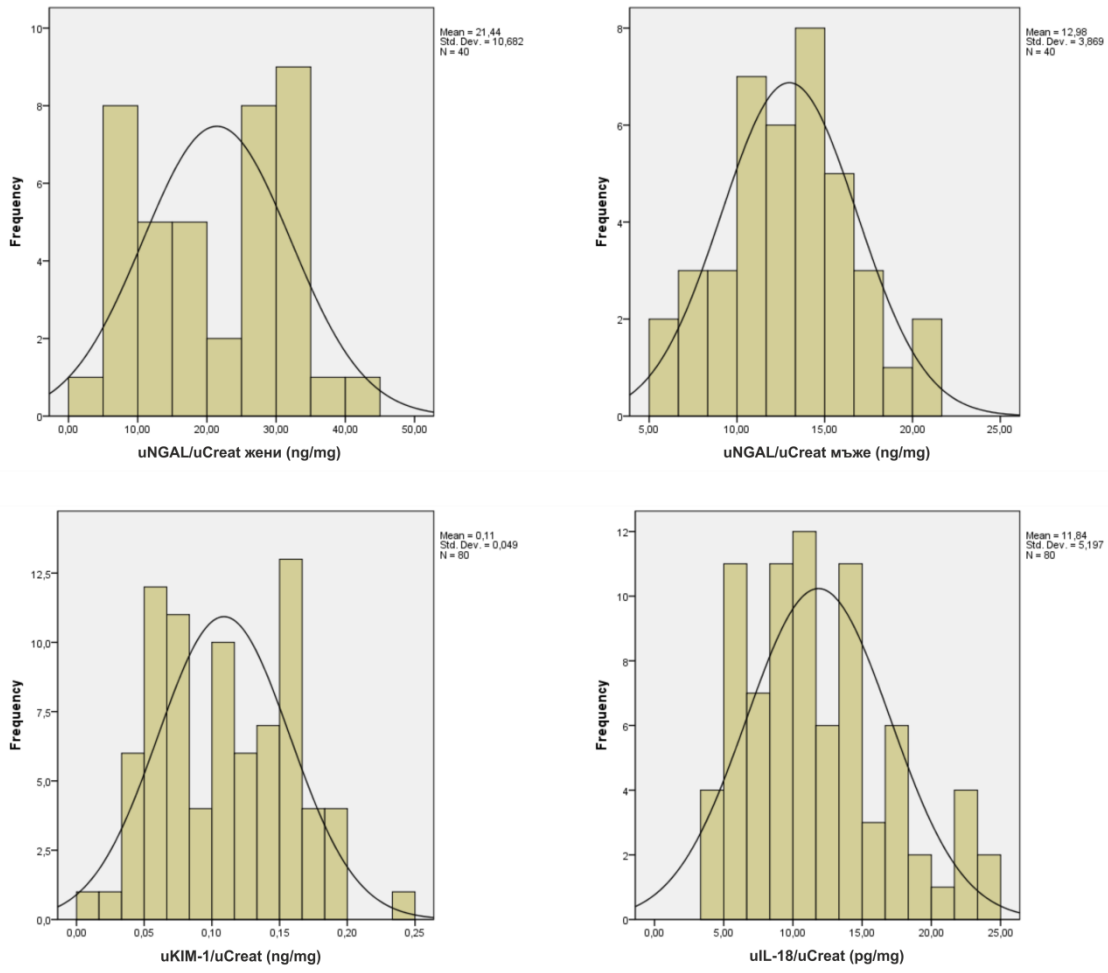
При uKIM-1/uCreat не се очертаха статистически значими разлики в получените резултати при двата пола, което наблюдавахме при анализа на абсолютните стойности. Това даде възможност резултатите на всички 80 здрави доброволци да бъдат обработени заедно.

При нормално разпределение на резултатите, изчислена $\bar{x}$ 0.110 и SD 0.049, по формулата $\bar{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал) бяха

определени референтни граници за uKIM-1/uCreat за българската популация (мъже и жени) 0.012 – 0.208 ng/mg.

При uIL-18/uCreat, както и при анализа на абсолютните стойности, не се очертаха статистически значими разлики в получените резултати. Това даде възможност резултатите на всички 80 здрави доброволци да бъдат обработени заедно.

При нормално разпределение, изчислена $\bar{x}$ 11.84 и SD 5.2, по формулата $\bar{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал) бяха определени референтни граници за uIL-18/uCreat за българската популация (мъже и жени) 1.44 – 22.24 pg/mg.




Фигура 14. Разпределение на резултатите за uNGAL/uCreat, uKIM-1/uCreat и uIL18/uCreat при здравите контроли.

При трите представени съотношения клинично значимата област обхваща референтните граници, както и патологично високите стойности. Резултати, по-ниски от долната референтна граница нямат диагностично, прогностично или друго клинично значение. Това дава основание за по-голямо удобство да се ползват само горните референтни граници, подобно на други показатели, като албумин и общ белтък в инстантна урина, представяни като съотношения спрямо креатинина в урина.

Таблица 7. Опростено представяне на референтните граници за uNGAL/uCreat, uKIM-1/uCreat и uIL-18/uCreat.

| **Показател** | **Пол** | **Референтни граници** |
|---|---|---|
| uNGAL/uCreat | жени | до 42.80 ng/mg |
| | мъже | до 20.72 ng/mg |
| | | |
| uKIM-1/uCreat | | до 0.208 ng/mg |
| uIL-18/uCreat | | до 22.24 pg/mg |

## ПРИЛОЖЕНИЕ НА uNGAL, uKIM-1 И uIL-18

### 1. ПАЦИЕНТИ, ПОДЛЕЖАЩИ НА ПЛАНОВА СЪРДЕЧНА ОПЕРАЦИЯ, ВКЛЮЧВАЩА КАРДИОПУЛМОНАЛЕН БАЙПАС

Беше проведено проспективно клинично проучване съвместно с УМБАЛ „Света Екатерина“ ЕАД и Централна клинична лаборатория при УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, протоколът от което е изготвен в съответствие с Декларацията от Хелзинки и одобрен от Етичната комисия към Съвета за медицинска наука, МУ - София. От всеки пациент предварително беше получено писмено информирано съгласие относно предстоящите изследвания. Всички пациенти, включени в проучването, бяха планувани за сърдечна операция под ЕКК (екстракорпорално кръвообращение), включваща КПБ (кардиопулмонален байпас). Изключващите критерии бяха: възраст под 18 г., бременност, предшестваща хирургична интервенция през последните 30 дни, отказ от даване на информирано съгласие.

От медицинските досиета бяха използвани демографските характеристики, предоперативните лабораторни променливи, интра- и постоперативните показатели, включително нивата на sCreat. Базовата GFR беше изчислена по MDRD формулата.

Уринните проби бяха взети между 2 и 6 ч. след ЕКК и съхранени в аликвоти при -20◦C. sCreat беше определен рутинно при приема и на 48-ия час след хирургичната интервенция. ОБУ и тежестта му бяха дефинирани като ≥50% повишение на sCreat спрямо изходното ниво, съгласно RIFLE критериите. Продължителността на ОБУ беше дефинирана въз основа на броя дни с повишен ≥50% sCreat над изходното ниво.

При анализирането на резултатите бяха сравнени демографските характеристики, базовите нива на sCreat, резултатите за uNGAL, uKIM-1, uIL-18 и uCreat, измерени на 2 - 6 час след ЕКК, и клиничният изход между пациентите, развили ОБУ, и тези без данни за ОБУ. В допълнение резултатите на уринните биомаркери бяха представени и като съотношения спрямо уринния креатинин, като по този начин бяха компенсирани някои демографски променливи с цел осигуряване на по-добра сравнимост и по-висока надеждност на резултатите.

В проучването бяха включени 160 пациенти на средна възраст 65 г., от които 44% от женски пол. Средната предоперативна GFR беше 91 mL/min/1.73 $m^2$, изчислена по MDRD формулата. Рутинните серийни измервания на sCreat предоперативно показаха стабилни стойности и никой от участниците не показа данни за предоперативно ОБУ. При всички включени в проучването пациенти беше постигната кардиоплегия след външно аортно клампиране посредством анте-/ретроградeн студен кардиоплегичен арест. Сърдечната функция беше възстановена спонтанно чрез топла реперфузия или посредством дефибрилация.

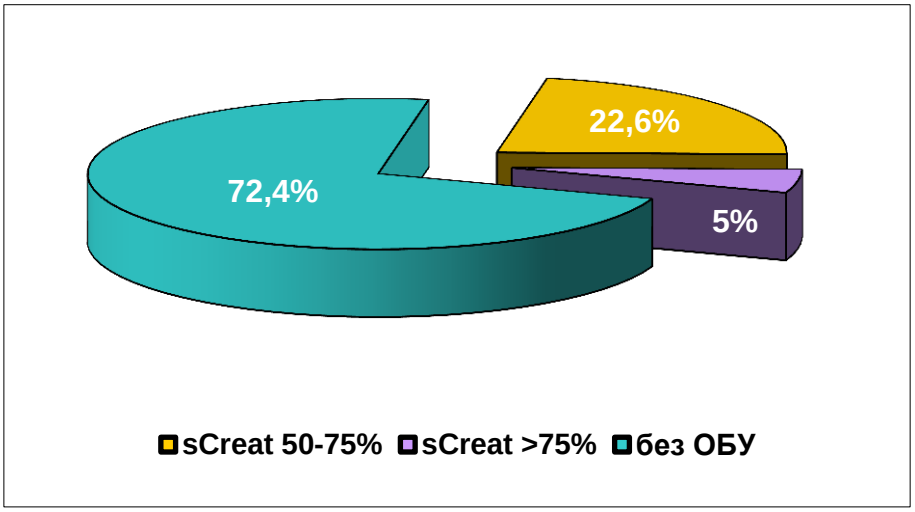
Таблица 8. Демографски и клинични характеристики на пациентската група.

| | Пациенти с ОБУ | Пациенти без ОБУ | P |
|---|---|---|---|
| Общ брой | 44 (27.5%) | 116 (72.5%) | - |
| Мъже | 21/90 (23.3%) | 69/90 (76.7%) | - |
| Жени | 23/70 (32.9%) | 47/70 (67.1%) | - |
| Средна възраст | 67.5 (±8.5) | 64 (±5.4) | <0.001 |
| Средна продължителност на ЕКК (min) | 134 (±26) | 110 (±18) | <0.0001 |
| Средна предоперативна eGFR (MDRD) | 89* | 92* | <0.001 |
| ΔsCreat % (T=48ч.) | 97 | 13 | <0.001 |
| Удължен болничен престой (дни) | 11.2 ± 3.6 | 0 | <0.001 |
| Необходимост от диализа | 6 | 0 | <0.0001 |
| Смърт | 4 | 0 | <0.0001 |

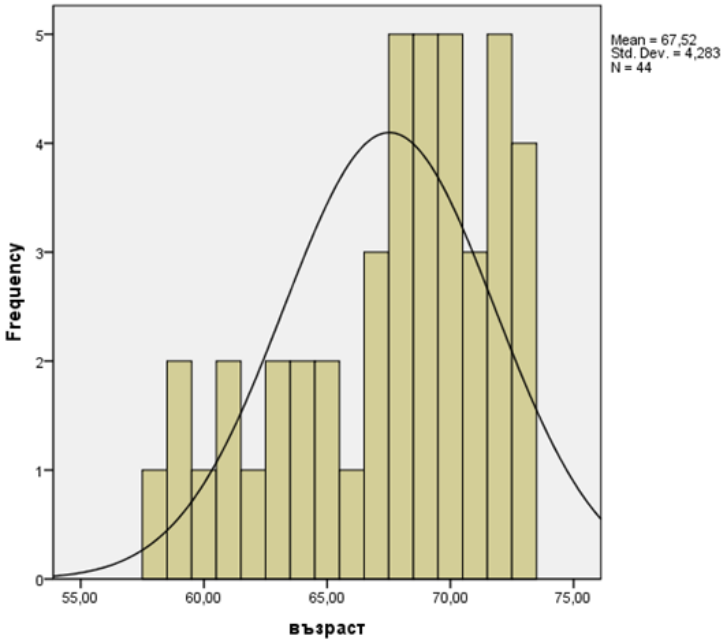
** GFR, изчислена по MDRD формулата в mL/min/1.73$m^2$*

При 27.5% от пациентите стойностите на sCreat на 48-ия час след ЕКК бяха повишени с над 50% от изходните- дискриминанта за разграничение на пациентите с ОБУ от тези без ОБУ (RIFLE).

В допълнение пациентите с ОБУ бяха разделени на две групи- 1) с повишен sCreat 50-75% от изходното ниво и 2) с повишен sCreat над 75% от изходното ниво.

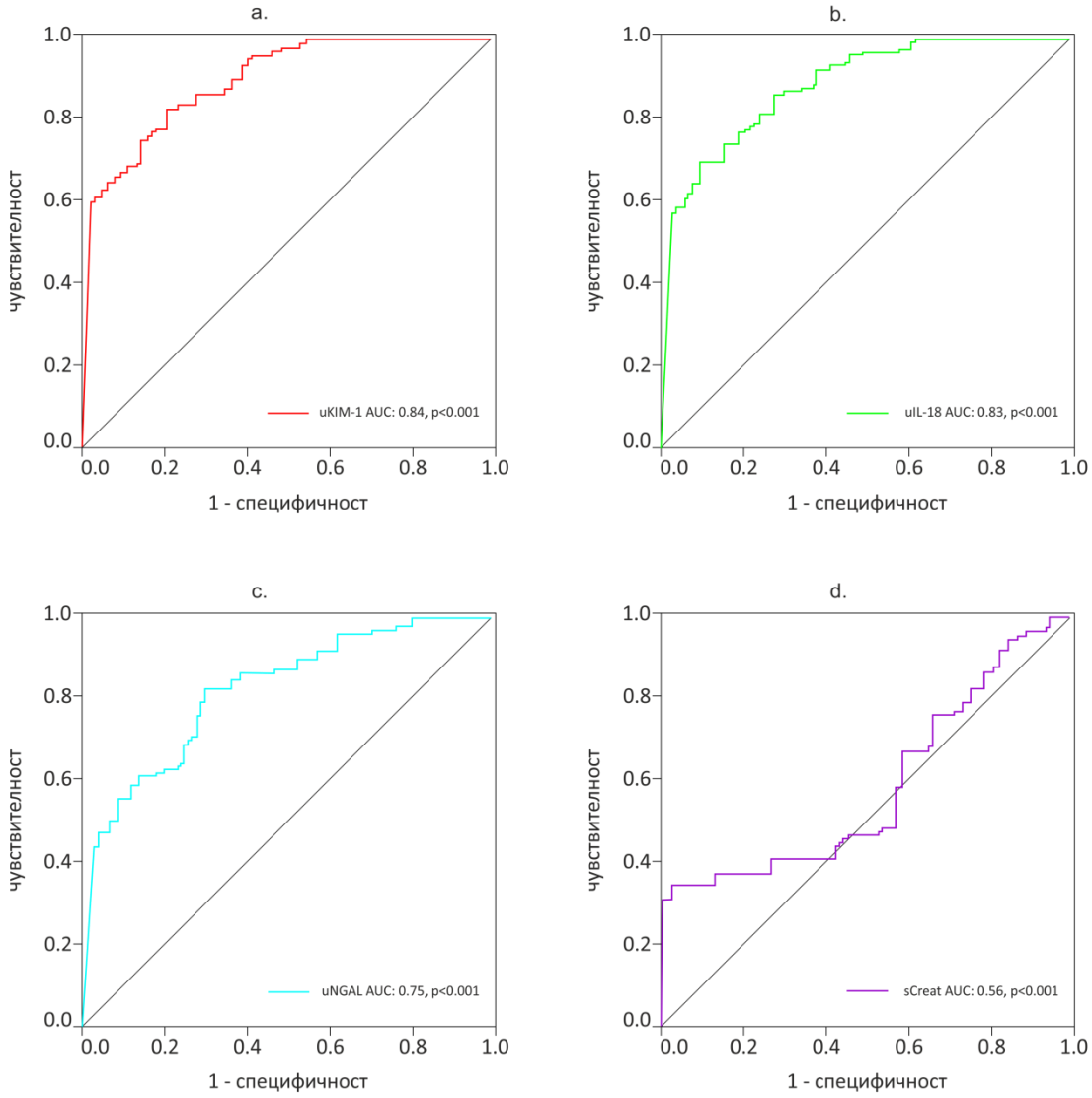



Фигура 15. Разпределение на пациентите (n=160) по наличие или отсъствие на ОБУ и неговата тежест.




Фигура 16. Разпределение по възраст на пациентите с ОБУ, дефинирано съгласно RIFLE критериите.

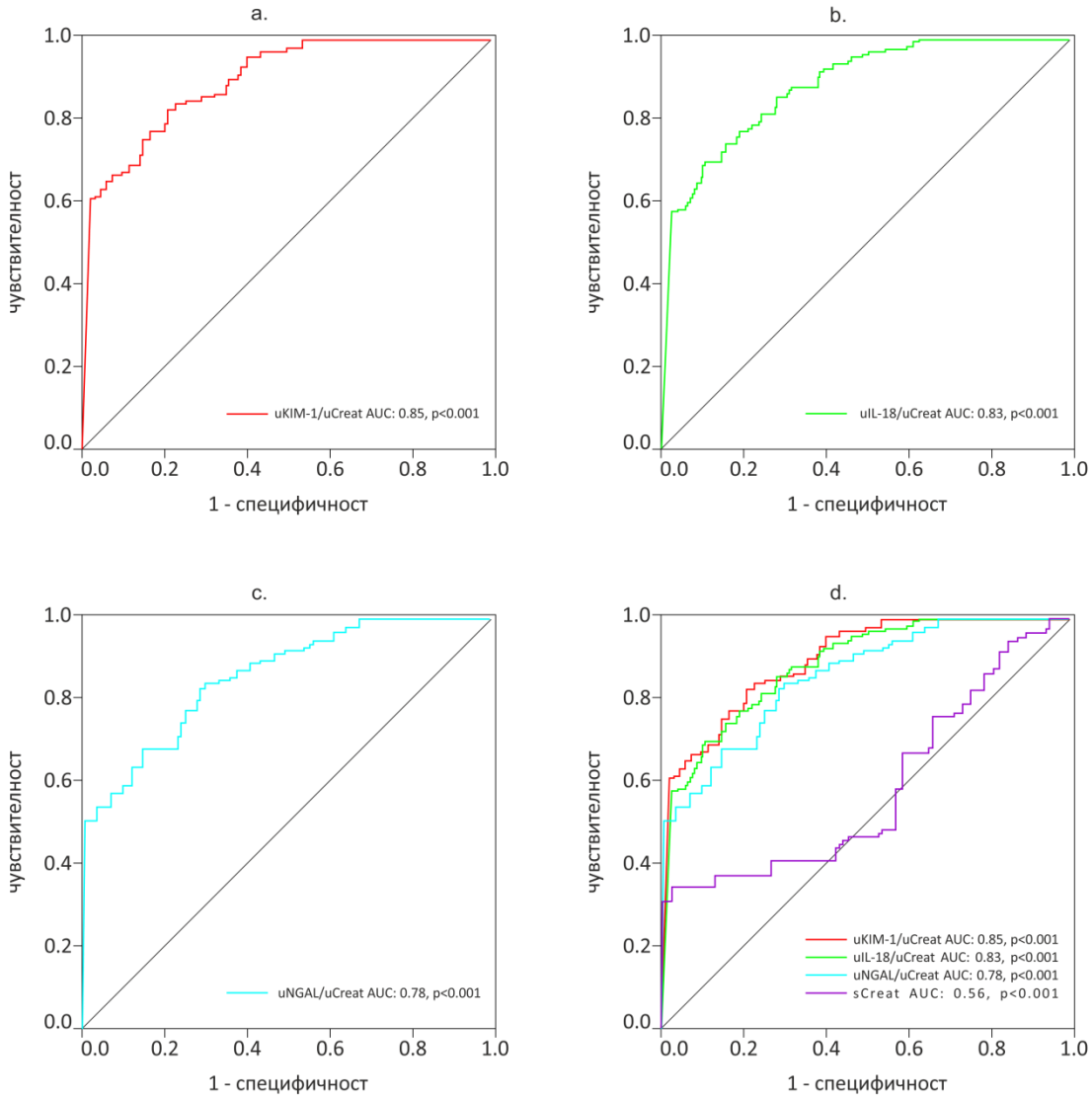
При самостоятелно определяне на структурните уринни показатели 2-6 часа след КПБ резултатите от ROC-анализа показаха най-висока AUC (област под кривата) за uKIM-1- 0.84 (p<0.001). При uIL-18 се получиха съпоставими резултати- AUC 0.83 (p<0.001). uNGAL показа най-ниска диагностична чувствителност и специфичност с AUC 0.75 (p<0.001).




Фигура 17. ROC (receiver operator characteristic) криви.

*a. диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1 по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ; b. диагностична специфичност и чувствителност на uIL-18 по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ; c. диагностична специфичност и чувствителност на uNGAL по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ; d. диагностична специфичност и чувствителност на sCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ.*

За изчислените съотношения на структурните уринни показатели спрямо уринния креатинин, анализът на ROC кривите показа uKIM-1/uCreat AUC 0.85 (p<0.001), uIL-18/uCreat AUC 0.83 (p<0.001) и uNGAL/uCreat AUC 0.78 (p<0.001).




Фигура 18. ROC (receiver operator characteristic) криви.

*a. диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ; b. диагностична специфичност и чувствителност на uIL-18/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ; c. диагностична специфичност и чувствителност на uNGAL/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ; d. диагностична специфичност и чувствителност на изчислените съотношения за uKIM-1, uIL-18 и uNGAL спрямо уринния креатинин и специфичността и чувствителността на sCreat по отношение развитието на ОБУ, измерени в първите 2-6 часа след КПБ.*

С цел постигане на максимална прогностична стойност бяха анализирани различни комбинации от уринни показатели. Получените резултати бяха сравнени с резултатите от изчислените съотношения спрямо уринния креатинин на uNGAL като най-добре проученият към момента маркер за ранно диагностициране на ОБУ и показал отлична диагностична чувствителност и специфичност. Анализът показа, че комбинацията от изчислените съотношения на трите изследвани ранни уринни показатели, измерени 2-6 часа след КПБ, е с най-висока прогностична стойност по отношение развитието на ОБУ.

Таблица 9. Комбинации от изчислени съотношения на ранни уринни показатели спрямо уринен креатинин и промяната в тяхната прогностична стойност в сравнение със самостоятелно определяне на uNGAL/uCreat.

| | **Комбинация** | **p<0.01** | **T = 2 – 6 ч.** **ΔAUC*** |
|---|---|---|---|
| I. | uNGAL/uCreat<br>uIL-18/uCreat | да | 0.09 |
| II. | uNGAL/uCreat<br>uKIM-1/uCreat | да | 0.12 |
| III. | uNGAL/uCreat<br>uKIM-1/uCreat<br>uIL-18/uCreat | да | 0.15 |

**ΔAUC- промяна в AUC в сравнение със самостоятелното определяне на uNGAL/uCreat*

Беше установена ниска степен на корелация между възрастта и измерените нива на uNGAL в първите 6 часа след КПБ, при пациентите развили постоперативно ОБУ. Налице е умерена степен на корелация между възрастта и uKIM-1, измерен при същите условия.

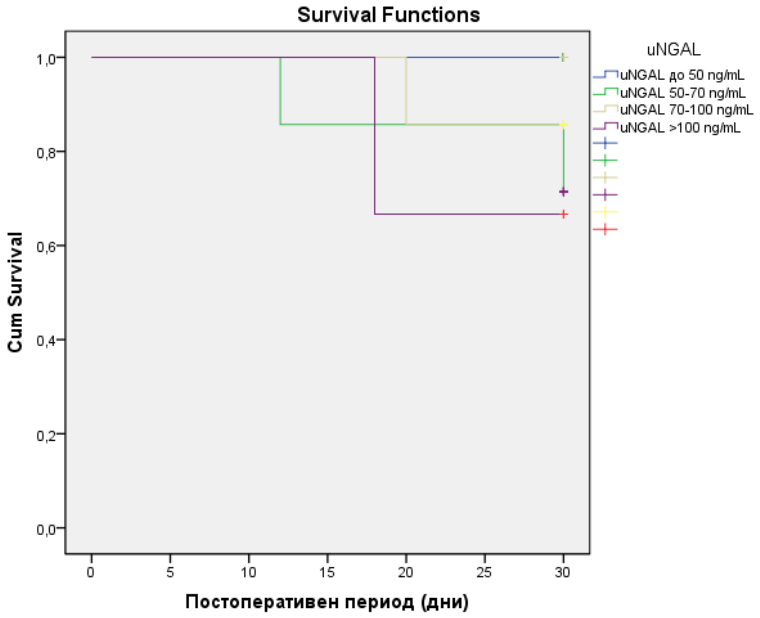
От друга страна има висока степен на корелация между продължителността на операцията и трите предложени ранни уринни показатели при пациентите, развили постоперативно ОБУ.

Таблица 10. Корелация между възраст, продължителност на операцията и ранните уринни показатели.

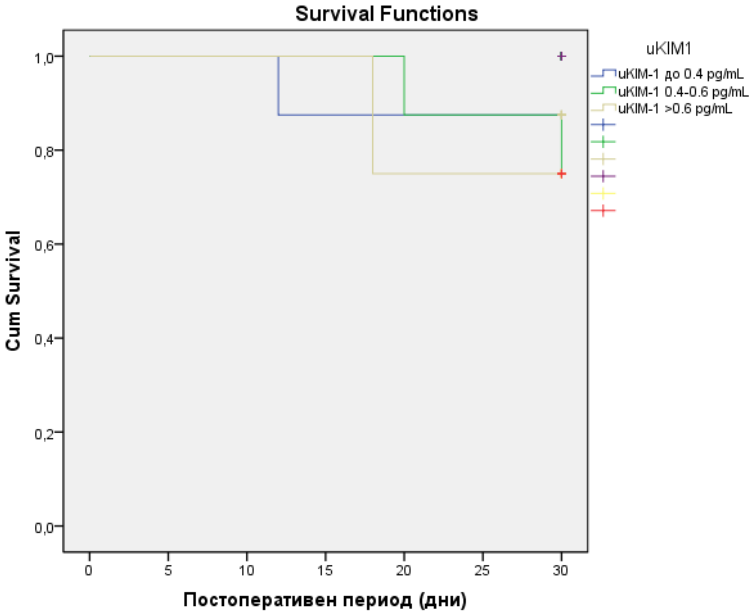
| | | uKIM1 (T=2-6 ч) | uIL18 (T=2-6 ч) | uNGAL (T=2-6 ч) |
|---|---|---|---|---|
| възраст | Pearson Correlation | ,433** | ,231 | ,343* |
| | Sig. (2-tailed) | ,003 | ,132 | ,023 |
| | N | 44 | 44 | 44 |
| КПБ мин. | Pearson Correlation | ,774** | ,743** | ,729** |
| | Sig. (2-tailed) | ,000 | ,000 | ,000 |
| | N | 44 | 44 | 44 |

**p<0.05, **p<0.01*

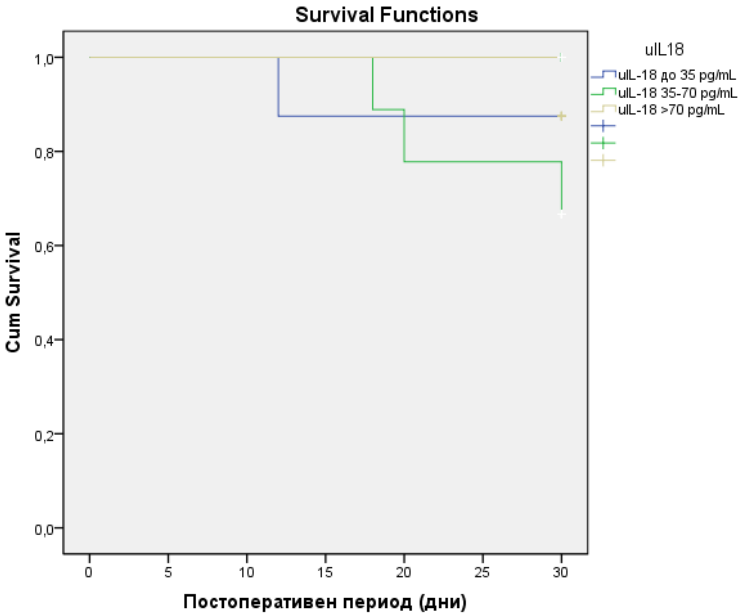
За оценка на 30-дневната преживяемост при пациентите, развили ОБУ, беше построена крива на Kaplan-Meier, като пациентите бяха стратифицирани въз основа на степента на повишение на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18.




Фигура 19. Крива на Kaplan-Meier. Преживяемост в зависимост от нивото на uNGAL.




Фигура 20. Крива на Kaplan-Meier. Преживяемост в зависимост от нивото на uKIM-1.




Фигура 21. Крива на Kaplan-Meier. Преживяемост в зависимост от нивото на uIL-18.

## 2. ПАЦИЕНТИ, ПОСТЪПВАЩИ В СПЕШНО ОТДЕЛЕНИЕ С РАЗЛИЧНИ ПАТОЛОГИЧНИ СЪСТОЯНИЯ

Тъй като клиничните белези и симптоми на ОБУ не са специфични, разграничаването му при прием в спешно отделение е трудно. Оценката, базирана на серумния креатинин, отнема няколко дни, което води до забавяне на подходящата терапия. Освен това прилагането на RIFLE критериите при тази група пациенти представлява истинско предизвикателство, тъй като предболничните предполагаемо стабилни креатининови нива в повечето случаи са неясни.

Всичко това води до огромна необходимост от въвеждане на нови показатели, които да могат да дадат ранна диагноза на ОБУ, да разграничат ОБУ от обем-зависима бъбречна дисфункция, хронично бъбречно заболяване и запазена бъбречна функция.

Беше проведено проспективно клинично проучване съвместно с МБАЛ Благоевград и Централна клинична лаборатория при УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, протоколът от което е изготвен в съответствие с Декларацията от Хелзинки и одобрен от Етичната комисия към Съвета за медицинска наука, МУ - София. От всеки пациент предварително беше получено писмено информирано съгласие относно предстоящите изследвания.

Изключващи критерии: възраст под 18 г., невъзможност от страна на пациента да даде информирано съгласие, бременност, неотложна нужда от диализа или рентгено-контрастно изследване, данни за хирургична интервенция през последните 30 дни, отказ от участие в проучването.

За изходно ниво на серумния креатинин беше взето това, измерено при постъпване в спешното отделение. На втория час след приема бяха взети уринни проби и изследвани за uCreat, uNGAL, uKIM-1 и uIL-18. Резултатите за трите уринни показатели не бяха съобщени на лекуващите екипи и не оказаха влияние върху медицинската оценка на състоянието на пациентите.

На 48-ия час след постъпване в спешното отделение, беше взета венозна кръв и отделен серум за определяне на серумен креатинин.

От общо 74 пациенти, включени в проучването, при 15 (20.3%) беше потвърдено остро бъбречно увреждане въз основа на експертна медицинска оценка. При първичния преглед в спешно отделение само при 4 пациенти беше установено остро бъбречно увреждане на база повишени нива на серумен креатинин (съгласно RIFLE критериите), което се потвърди и като окончателна диагноза. При останалите 11 пациенти острото бъбречно увреждане не беше идентифицирано в първите часове след постъпването.

Таблица 11. Демографски и клинични характеристики на пациентската група.

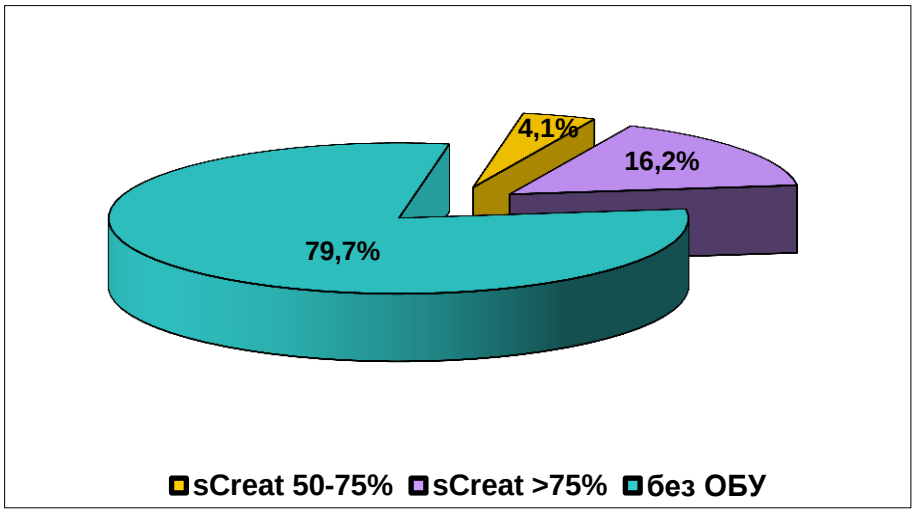
| | **Общ брой пациенти** | **Пациенти с ОБУ** | **Пациенти без без ОБУ** |
|---|---|---|---|
| Общ брой | 74 | 15 (20.3%) | 59 (79.7%) |
| Мъже | 49 (66.2%) | 9 (12.2%) | 40 (87.8%) |
| Жени | 25 (33.8%) | 6 (8.1%) | 19 (91.9%) |
| Средна възраст | 59.5 | 58.6 | 60.4 |
| | | | |
| ОМИ* | 5 (6.8%) | 1/15 (6.7%) | 4/74 (5.4%) |
| Мозъчен инсулт | 3 (4.1%) | 1/15 (6.7%) | 2/74 (2.7%) |
| Сепсис | 4 (5.4%) | 4/15 (26.7%) | 0 |
| Множествени травми | 19 (25.7%) | 6/15 (40%) | 13/74 (17.6%) |
| Декомпенсиран диабет | 2 (2.7%) | 1/15 (6.7%) | 1/74 (1.4%) |
| Тежка дехидратация | 1 (1.4%) | 1/15 (6.7%) | 0 |
| ХБЗ** | 6 (8.2%) | 1/15 (6.7%) | 5/74 (6.8%) |
| Други | 34 (45.9%) | 0 | 34/74 (45.9%) |

**ОМИ- остър миокарден инфаркт*

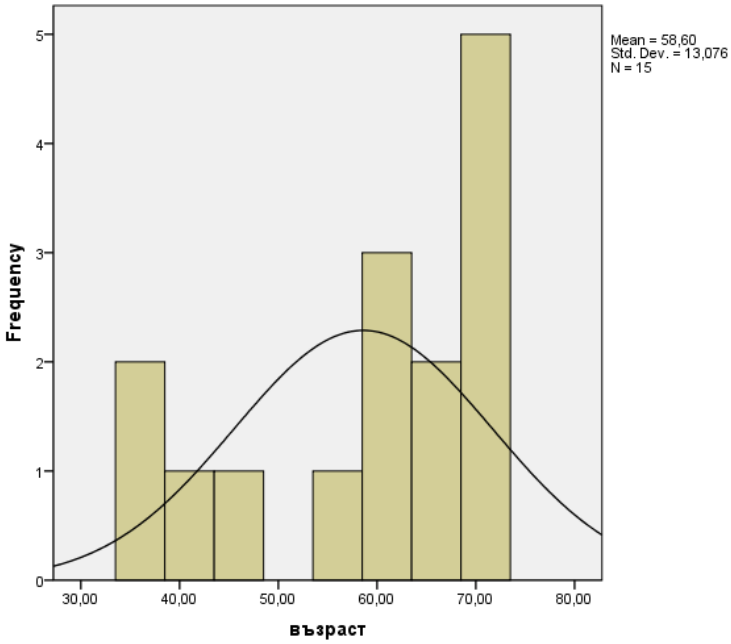
***ХБЗ- хронично бъбречно заболяване*

При 15 (20.3%) от пациентите стойностите на sCreat на 48-ия час след постъпване в спешното отделение бяха повишени с над 50% от изходните - дискриминанта за разграничение на пациентите с ОБУ от тези без ОБУ (RIFLE).

В допълнение пациентите с ОБУ бяха разделени на две групи- 1) с повишен sCreat 50-75% от изходното ниво и 2) с повишен sCreat над 75% от изходното ниво.




Фигура 22. Разпределение на пациентите (n=74) по наличие или отсъствие на ОБУ и неговата тежест.

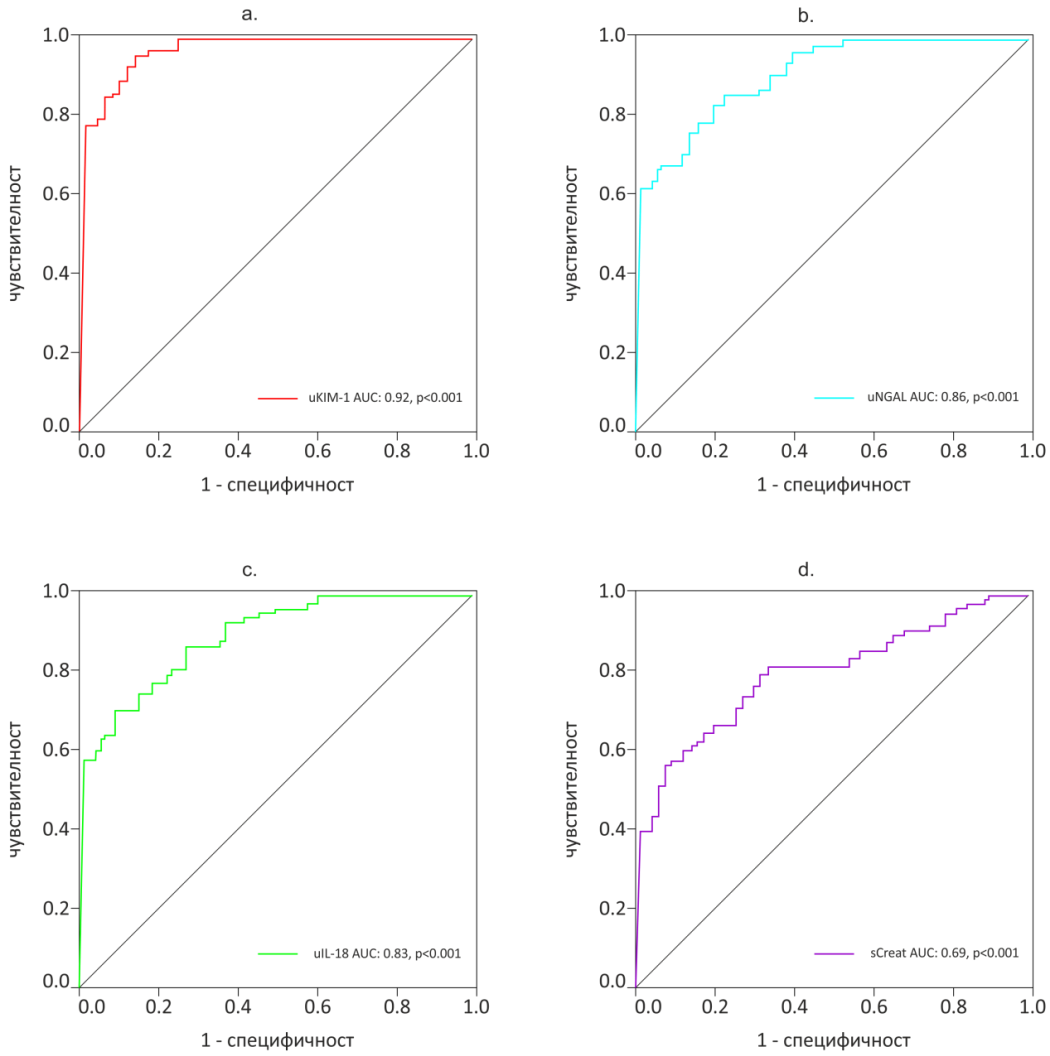



Фигура 23. Разпределение на пациентската група по възраст.

Измерените нива на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 при пациентите с окончателна диагноза ОБУ бяха значително повишени в сравнение с пациентите, които не развиха ОБУ. За прогнозиране и оценка на ОБУ беше изчислена AUC на ROC кривата за трите структурни показателя. Анализът на ROC кривата показа, че uNGAL, uKIM-1 и IL-18, измерени

самостоятелно при постъпване в спешно отделение са с висока предиктивна стойност по отношение развитието на ОБУ.

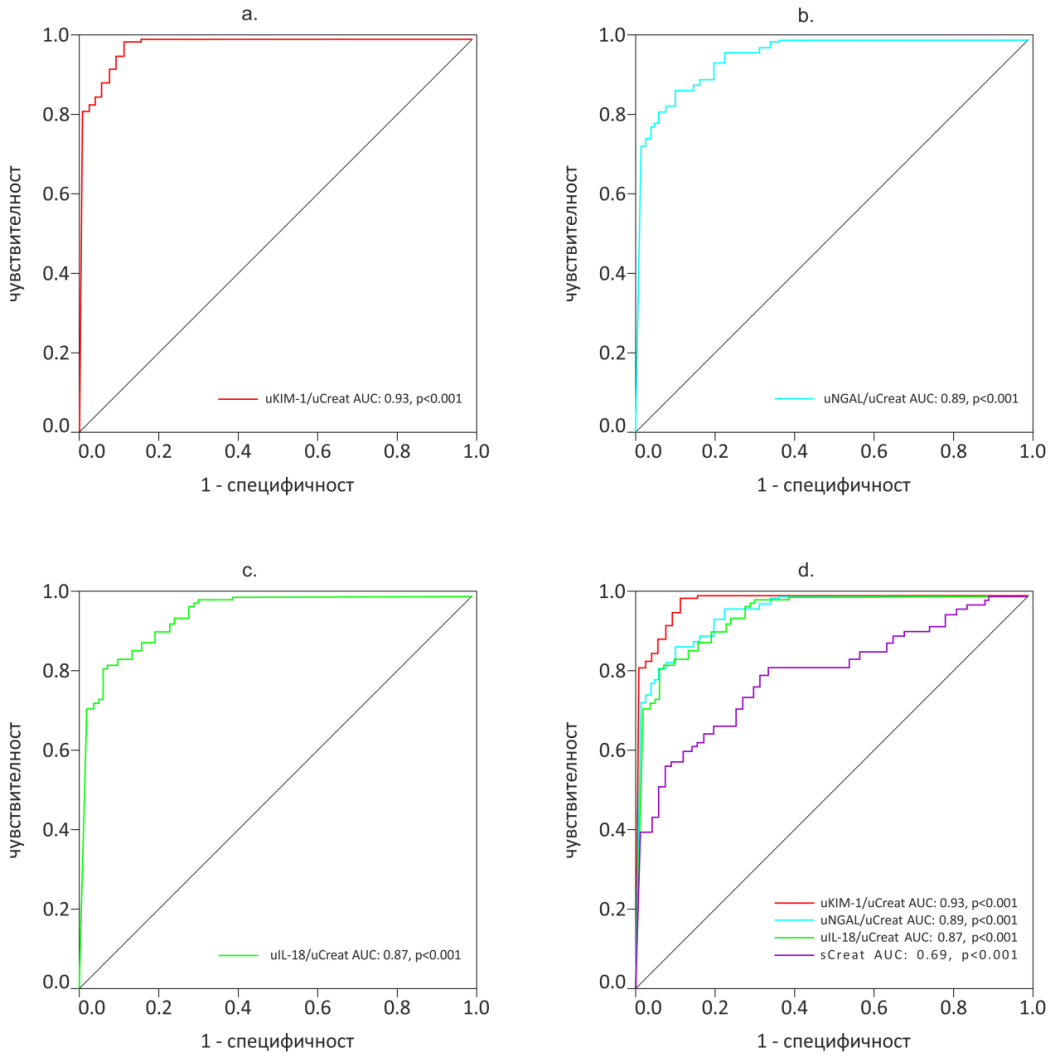
При самостоятелно определяне на структурните уринни показатели на 2-ия час след постъпване в спешно отделение резултатите от ROC-анализа показаха най-висока AUC (област под кривата) за uKIM-1- 0.92 (p<0.001); за uNGAL- AUC 0.86 (p<0.001);за uIL-18- AUC 0.83 (p<0.001).




Фигура 24. ROC (receiver operator characteristic) криви.

*a. диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1 по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване в спешно отделение; b. диагностична специфичност и чувствителност на uNGAL по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване; c. диагностична специфичност и чувствителност на uIL-18 по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване; d. диагностична специфичност и чувствителност на sCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване.*

За изчислените съотношения на структурните уринни показатели спрямо уринния креатинин, анализът на ROC кривите показа uKIM-1/uCreat AUC 0.93 (p<0.001), uNGAL/uCreat AUC 0.89 (p<0.001) и uIL-18/uCreat AUC 0.87 (p<0.001).




Фигура 25. ROC (receiver operator characteristic) криви.

*a. диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване в спешно отделение; b. диагностична специфичност и чувствителност на uNGAL/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване; c. диагностична специфичност и чувствителност на uIL-18/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване; d. диагностична специфичност и чувствителност на изчислените съотношения за uKIM-1, uNGAL и uIL-18 спрямо уринния креатинин и специфичността и чувствителността на sCreat по отношение развитието на ОБУ, измерени на 2-ия час след постъпване.*

С цел постигане на максимална прогностична стойност бяха анализирани различни комбинации от уринни показатели. Получените резултати бяха сравнени с резултатите от изчислените съотношения спрямо уринния креатинин на uNGAL. Анализът показа, че комбинацията от изчислените съотношения на трите изследвани ранни уринни показатели, измерени 2-6 часа след КПБ, е с най-висока прогностична стойност по отношение развитието на ОБУ.

Таблица 12. Комбинации от изчислени съотношения на ранни уринни показатели спрямо уринен креатинин и промяната в тяхната прогностична стойност в сравнение със самостоятелно определяне на uNGAL/uCreat.

| | **Комбинация** | **p<0.01** | **T = 2**<br>**ΔAUC*** |
|---|---|---|---|
| I. | uNGAL/uCreat<br>uIL-18/uCreat | да | 0.02 |
| II. | uNGAL/uCreat<br>uKIM-1/uCreat | да | 0.05 |
| III. | uNGAL/uCreat<br>uKIM-1/uCreat<br>uIL-18/uCreat | да | 0.08 |

**ΔAUC- промяна в AUC в сравнение със самостоятелното определяне на uNGAL/uCreat*

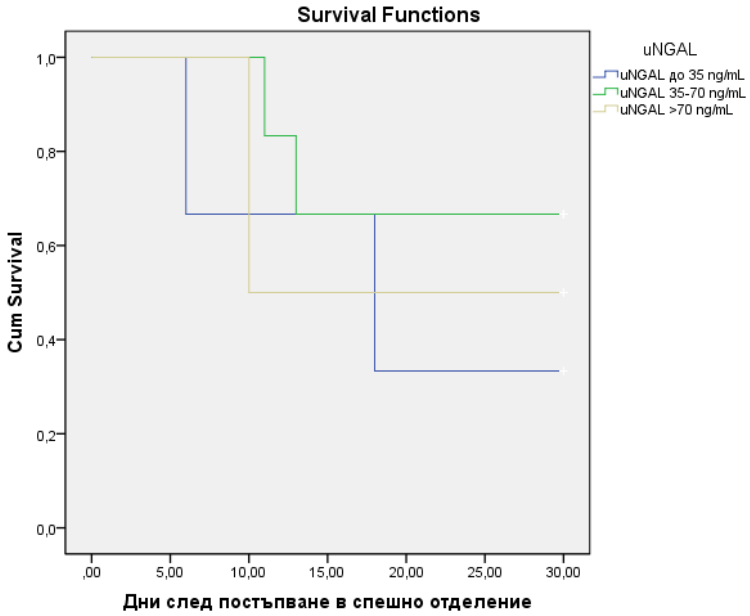
Беше установена умерена степен на корелация между възрастта и измерените нива на uIL-18 на втория час след постъпване в спешно отделение при пациентите, развили ОБУ и висока степен на корелация между степента на бъбречно засягане и измерените нива на uNGAL и uIL-18.

Таблица 13. Корелация между възраст, продължителност на операцията и ранните уринни показатели.

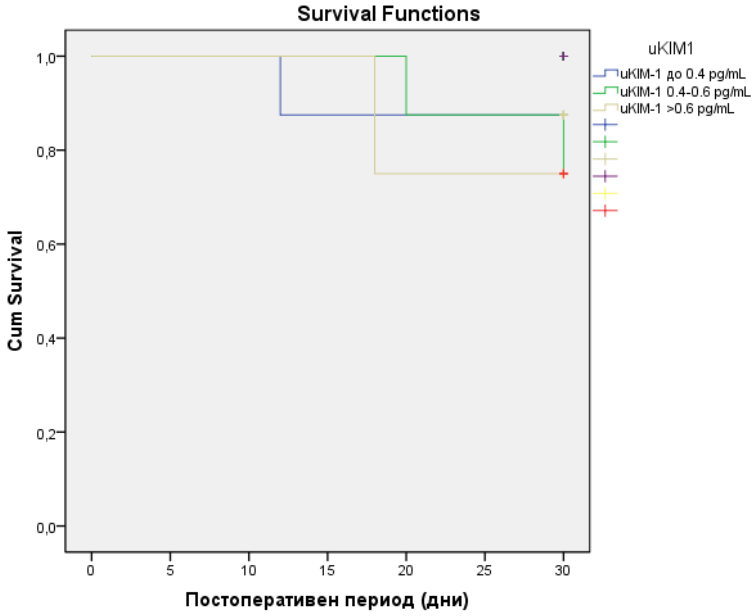
| | | uKIM-1 (T=2) | uNGAL (T=2) | uIL-18 (T=2) |
|---|---|---|---|---|
| възраст | Pearson Correlation | ,380 | ,470 | ,520* |
| | Sig. (2-tailed) | ,162 | ,077 | ,047 |
| | N | 15 | 15 | 15 |
| ОБУ стадий | Pearson Correlation | ,339 | ,769** | ,822** |
| | Sig. (2-tailed) | ,217 | ,001 | ,000 |
| | N | 15 | 15 | 15 |

**p<0.05, **p<0.01*

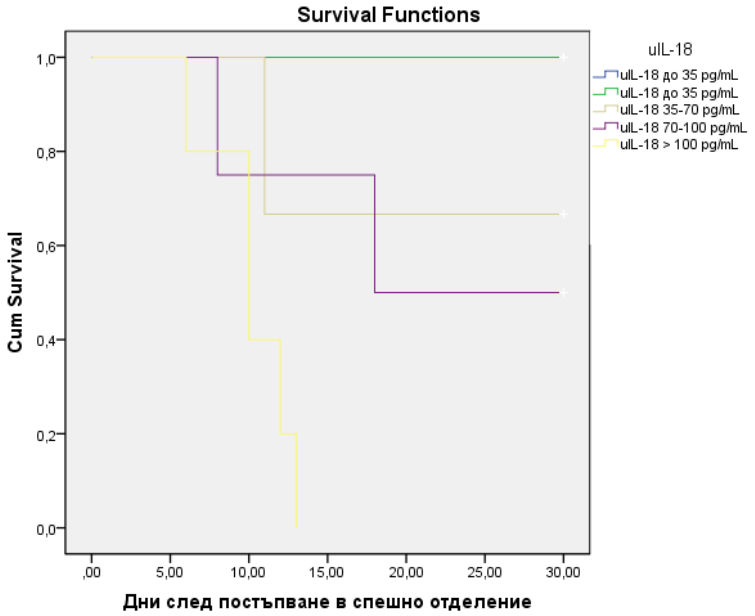
За оценка на 30-дневната преживяемост при пациентите, развили ОБУ, беше построена крива на Kaplan-Meier, като пациентите бяха стратифицирани въз основа на степента на повишение на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18: Фигури 34, 35 и 36.




Фигура 26. Крива на Kaplan-Meier. Преживяемост в зависимост от нивото на uNGAL.




Фигура 27. Крива на Kaplan-Meier. Преживяемост в зависимост от нивото на uKIM-1.




Фигура 28. Крива на Kaplan-Meier. Преживяемост в зависимост от нивото на uIL-18.

## ОБСЪЖДАНЕ

Острото бъбречно увреждане представлява рязко отпадане на бъбречната функция със или без промяна в продукцията на урина. Причините и клиничната презентация могат да бъдат различни, като при повечето пациенти с лека до умерена степен на засягане отсъстват обективни симптоми и се диагностицират само с помощта на лабораторни тестове. Диагнозата, базирана на номинално или процентно повишение на серумния креатинин, може да бъде поставена средно 2 дни по-късно от момента на инициалното увреждане при пациенти с предшестваща нормална бъбречна функция.

Късното покачване на sCreat, множеството извънренални променливи, които влияят на нивата му, невъзможността с негова помощ да се разграничи ОБУ от преренална азотемия , както и големите компенсаторни възможности на бъбрека, налагат търсенето на нови, по-чувствителни и специфични показатели, които да индикират рано структурното увреждане.

Резултатите от верифицирането на ELISA методите за определяне на NGAL, KIM-1 и IL-18 в урина показаха висока аналитична надеждност, в съответствие с международните изисквания. При определяне на референтните граници за трите структурни показатели се получиха статистически значими разлики при uNGAL и uKIM-1 между двата пола, с по-високи нива при жените.

Представянето на резултатите като съотношения спрямо уринния креатинин позволи по-добра сравнимост, особено при нестандартизирани условия за вземане на биологичен материал при конкретни пациентски ситуации, например пациенти, постъпващи в спешно отделение. Беше постигната по-добра сравнимост и при относително хетерогенна група пациенти, каквато са възрастни, подложени на сърдечна операция, включваща КПБ.

След нормализиране на резултатите при uNGAL/uCreat се запази статистически значима разлика между двата пола, докато при uKIM-1/uCreat и uIL-18/uCreat резултатите при двата пола бяха сравними. Също както при абсолютните стойности, така и при изчислените съотношения, резултатите под долната референтна граница нямат диагностично, прогностично или друго клинично значение. Това дава

основание за по-голямо удобство да се ползват само горните референтни граници.

Таблица 14. Опростено представяне на референтните граници за uNGAL/uCreat, uKIM-1/uCreat и uIL-18/uCreat.

| **Показател** | | **Референтни граници** |
|---|---|---|
| uNGAL/uCreat | жени<br>мъже | до 42.80 ng/mg<br>до 20.72 ng/mg |
| uKIM-1/uCreat | | до 0.208 ng/mg |
| uIL-18/uCreat | | до 22.24 pg/mg |

В заключение, верифицирането на ELISA методите за определяне на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 показа, че те могат надеждно да бъдат използвани рутинно за стандартни клинични или изследователски цели.

Самостоятелното измерване на трите предложени ранни уринни показатели 2-6 часа след КПБ показа много висока чувствителност и специфичност по отношение развитието на ОБУ. ROC-анализът разкри AUC за uKIM-1 0.84 ($p<0.001$), за uIL-18 0.83($p<0.001$) и за uNGAL 0.75 ($p<0.001$). Определената най-ниска AUC за uNGAL вероятно е свързана с наличието на съпътстващи патологични състояния като диабет, белодробни заболявания, възпаление, нерядко срещани при възрастни, които биха могли да повлияят концентрациите на uNGAL. Нашето проучване демонстрира по-висока AUC при изчислените съотношения спрамо uCreat в сравнение с абсолютните стойности на отделните уринни показатели, като анализът на ROC кривите показа uKIM-1/uCreat AUC 0.93 ($p<0.001$), uNGAL/uCreat AUC 0.89 ($p<0.001$) и uIL-18/uCreat AUC 0.87 ($p<0.001$).

Недостатъците на самостоятелното определяне на отделните уринни показатели провокира търсенето на оптимална комбинация (диагностичен панел) за ранно диагностициране на ОБУ, която да оптимизира чувствителността и специфичността. Анализът показа, че комбинацията от изчислените съотношения на трите изследвани ранни уринни показатели, измерени 2-6 часа след КПБ при пациенти, подложени на планова сърдечна операция, е с най-висока прогностична

стойност по отношение развитието на ОБУ, достигаща отлична AUC 0.97 ($p<0.001$).

С помощта на корелационен анализ беше установена ниска степен на корелация между възрастта и измерените нива на uNGAL в първите 6 часа след КПБ при пациентите, развили постоперативно ОБУ, и умерена степен на корелация между възрастта и uKIM-1. Установи се и висока степен на корелация между продължителността на операцията и трите предложени ранни уринни показатели при пациентите, развили постоперативно ОБУ.

Ранната детекция на ОБУ се явява критичен момент по отношение предприемането на адекватни терапевтични интервенции. Лечението трябва да започне далеч преди повишенивто на sCreat. Изключително важно е въвеждането на чувствителни показатели за тубулно увреждане с цел ранно диагностициране на ОБУ, тъй като към настоящия момент диагнозата и стадирането са базирани изключително на повишението на серумния креатинин или на намалението на уринната екскреция. sCreat е неприемливо нечувствителен и се повишава прекалено бавно, а уринната екскреция се влияе от използването на диуретици или преренална азотемия. Нашето проучване ясно демонстрира повишение на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18, измерени 2-6 часа след КПБ при пациенти, подложени на планова сърдечна операция. Комбинацията от трите уринни показатели показва още по-голяма чувствителност по отношение ранното диагностициране на ОБУ.

При пациентите, постъпващи в спешно отделение, ROC-анализът показа най-висока AUC за uKIM-1- 0.92 ($p<0.001$) и по-ниски AUC за uNGAL (0.86, $p<0.001$) и uIL-18 (AUC 0.83, $p<0.001$). За изчислените съотношения на структурните уринни показатели спрямо уринния креатинин, анализът на ROC кривите показа uKIM-1/uCreat AUC 0.93 ($p<0.001$), uNGAL/uCreat AUC 0.89 ($p<0.001$) и uIL-18/uCreat AUC 0.87 ($p<0.001$). С помощта на множествена логистична регресия бяха комбинирани трите показатели с цел разкриване на допълнителна диагностична стойност. В сравнение със самостоятелното определяне на uNGAL, като най-добре изучения към момента ранен уринен биомаркер, комбинацията от трите предложени показатели показа ΔAUC 0.08, достигайки AUC 0.93 ($p<0.001$). Нашето проучване, проведено сред

сравнително малка пациентска група (n=74) не разкри допълнителна диагностична стойност на диагностичния панел от трите уринни показатели в сравнение със самостоятелното определяне на uKIM-1/uCreat AUC 0.93 ($p<0.001$). От друга страна корелационният анализ показа умерена степен на корелация между възрастта и измерените нива на uIL-18 на втория час след постъпване в спешно отделение при пациентите, развили ОБУ, и висока степен на корелация между степента на бъбречно засягане и измерените нива на uNGAL и uIL-18. Корелацията между определените uKIM-1/uCreat и възрастта и стадия на ОБУ не беше статистически значима. От всичко това следва, че за ранно диагностициране на ОБУ при хетерогенна пациентска група, каквито са пациентите, постъпващи в спешно отделение, с различни патологични състояния, изчисленото съотношение uKIM-1/uCreat се явява оптимален показател както от клинична, така и от икономическа гледна точка.

## ИЗВОДИ

1. Данните от верифицирането на ELISA тип сандвич методи за количествено определяне на уринен NGAL, KIM-1 и IL-18 показаха много добри аналитични характеристики: аналитичен обхват (линейност), възпроизводимост и достоверност, отговарящи на националните и международни стандарти.

2. При определяне на референтните граници за българската популация се очертаха статистически значими разлики между двата пола за uNGAL и uKIM-1, представени като абсолютни стойности. И при двата показателя се получиха по-високи нива при здравите доброволци от женски пол. Нивата на uIL-18 не показаха статистически значими разлики между двата пола.

3. След нормализиране на резултатите и представянето им като съотношение спрямо уринния креатинин, при uNGAL/uCreat се запази статистически значимата разлика между здравите контроли от мъжки и жески пол. При uKIM-1/uCreat беше постигната сравнимост между резултатите на двата пола и бяха определени общи референтни граници за цялата популация. При uIL-18/uCreat, също както при абсолютните стойности, не се откри статистически значима разлика между двата пола.

4. Представянето на резултатите за uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 като съотношение спрямо uCreat позволява по-добра сравнимост на резултатите, както и получаване на надеждни резултати при нестандартизирани условия за взимане на биологичен материал, като по този начин се постига компенсиране на вариациите при инстантните проби.

5. При пациентите, подлежащи на планова сърдечна операция, включваща кардиопулмонален байпас, с най-висока прогностична стойност по отношение развитието на ОБУ е комбинацията от изчислените съотношения на трите ранни уринни показатели спрямо уринния креатинин, измерени 2-6 часа след КПБ.

6. При пациентите, подлежащи на планова сърдечна операция, включваща КПБ, има различна степен на положителна корелация между

измерените нива uKIM-1 и uNGAL и възрастта на пациентите, както и висока степен на корелация между измерените нива на трите ранни уринни показатели и продължителността на КПБ.

7. При пациентите, постъпващи в спешно отделение, с различни патологични състояния с най-висока прогностична стойност по отношение развитието на ОБУ е самостоятелното определяне на uKIM-1/uCreat, измерено на втория час след постъпването.

8. При пациентите, постъпващи в спешно отделение, с различни патологични състояния, е налице умерена степен на корелация между uIL-18 и възрастта на пациентите, както и висока степен на корелация между измерените нива uNGAL и uIL-18 и степента на бъбречно засягане.

## ПРИНОСИ

1. За първи път в България е въведено и е извършено аналитично валидиране (верифициране) на ELISA тип сандвич метод за определяне на уринен NGAL, KIM-1 и IL-18, включително определяне на референтни граници за българската популация.

2. За първи път в България получените стойности за uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 са представени като съотношение спрямо uCreat и са изготвени референтни граници за нормализираните стойности на трите показателя.

3. За първи път в българска група пациенти е документирана прогностичната роля на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18, както и на изчислените им съотношения спрямо уринния креатинин, измерени в първите часове след структурната увреда, по отношение развитието на ОБУ.

4. За първи път в българска група пациенти е съпоставена прогностичната роля на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18, както и на изчислените им съотношения спрямо уринния креатинин, измерени в първите часове след структурната увреда, със стандартните методи за диагностициране на ОБУ.

5. За първи път в България беше предложен и оценен като оптимален диагностичен панел за ранна диагноза на ОБУ след КПБ, включващ uNGAL/uCreat, uKIM-1/uCreat и uIL-18/uCreat, измрени 2-6 часа след КПБ.

6. За първи път в България беше предложено и оценено като оптимално самостоятелното определяне на uKIM-1/uCreat за ранна диагноза на ОБУ при пациенти, постъпващи в спешно отделение, с различни патологични състояния.

## НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Христова Ж, Цачев К. Биомаркери за ранно диагностициране на остро бъбречно увреждане. Доклад 015. IX Национален конгрес по клинична лаборатория с международно участие. к.к. Боровец, 09.2012.

2. Христова Ж, Цачев К. Нови структурни биомаркери за оценка на реналната функция и ранно диагностициране на остро бъбречно увреждане.-Мед Преглед, 2013;49(4): 5-13.

3. Hristova J, Georgieva B, Tzatchev K. Novel structural biomarkers for assessment of renal function and early diagnosis of acute kidney injury-NGAL. Oral presentation. 6$^{th}$ Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, IEMPAM, Bulgarian Academy of Sciences, 05.2015.

4. Hristova J, Dimitrova A, Tsaryanski G, et al. NGAL, IL-18, and KIM-1 in urine for early assessment of the risk of developing acute kidney injury in patients undergoing cardiopulmonary bypass.-Merit Res J Med Med Sci. 2015;3(6):228-232. **(IF 0.68)**

5. Hristova J, Dimitrova A, Tsaryanski G, et al. KIM-1 to urinary creatinine ratio for early detection of AKI in patients undergoing cardiopulmonary bypass.-IJSR. 2015;4(7):2196-98. **(IF 4.44)**

6. Hristova J, Tzatchev K. Urinalysis. In: Tzatchev K (Ed.), Guide to practical trainings in clinical chemistry for pharmacy students, Lax Book Ltd., Plovdiv, 2014, pp 123-142.

## НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. “Нови уринни биомаркери за ранно диагностициране на остро бъбречно увреждане при пациенти след кардиопулмонален байпас”, ДОГОВОР № 30/2013 г., ПРОЕКТ № 38, МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ, СЪВЕТ ПО МЕДИЦИНСКА НАУКА

2. “Определяне на NGAL, IL-18 и KIM-1 в урина за ранна оценка на риска от развитие на остро бъбречно увреждане при пациенти след кардиопулмонален байпас”, ДОГОВОР № 4/2014 г., ПРОЕКТ № 19, МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ, СЪВЕТ ПО МЕДИЦИНСКА НАУКА