МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология

Д-р Жулиета Заркова Христова-Димитрова

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

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “доктор“

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

София
2015

Съдържание

1. УВОД ……..... 7

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР ……..... 9

2.1. Патофизиология на острото бъбречно увреждане …….…… 9

2.1.1. Исхемия-реперфузия обусловено остро бъбречно увреждане ……..... 9

2.1.2. Септично остро бъбречно увреждане …….…… 11

2.1.3. Нефротоксини ……..…… 12

2.1.4. Кардиоренален и хепаторенален синдром …….…… 13

2.2. Рискови фактори за развитието на остро бъбречно увреждане ……..... 14

2.3. Честота на острото бъбречно увреждане ……..... 16

2.4. Характеристики на идеалните биомаркери за остро бъбречно увреждане ……..... 21

2.5. Неутрофилен гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) … 24

2.1.1. Предимства и недостатъци на NGAL като биомаркер за остро бъбречно увреждане …….…….. 31

2.6. Молекула за бъбречно увреждане-1 (KIM-1) ……..... 32

2.7. Интерлевкин-18 (IL-18) ……..... 35

2.8. Методи за определяне 37

2.8. Обобщение ……..... 39

3. ЦЕЛ НА ПРОУЧВАНЕТО ……..... 43

4. ЗАДАЧИ ……..... 43

5. МАТЕРИАЛ ……..... 44

6. МЕТОДИ ……..... 46

6.1. Стандартизиране на условията за взимане на биологичен материал при здравите контроли ……..... 46

6.2. Стандартизиране на условията за взимане на биологичен материал при пациентските групи ……..... 47

6.3. Ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) за определяне на Human Lipocalin-2/NGAL в урина ……..…..…… 49

6.4. Ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) за определяне на Human KIM-1 ……..... 51

6.5. Ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) за определяне на Human IL-18 в урина ……..…….…….... 53

6.6. Нормализиране на получените резултати ……..... 55

6.7. Ензимен PAP метод за определяне на креатинин 55

6.8. Статистически методи …….. 56

7. РЕЗУЛТАТИ ……..…. 58

7.1. Верифициране на Human Lipocalin-2/NGAL ELISA в урина . 58

7.1.1. Аналитичен обхват (линейност) ……..…..…… 58

7.1.2. Проверка на калибрационната крива ……..….. 60

7.1.3. Невъзпроизводимост ……..…… 60

7.1.4. Достоверност ……..…..... 61

7.1.5. Определяне на референтни граници ……..….. 62

7.2. Верифициране на Human KIM-1 ELISA в урина …….…….. 65

7.2.1. Аналитичен обхват (линейност) ……..…..…… 65

7.2.2. Проверка на калибрационната крива ……..…. 66

7.2.3. Невъзпроизводимост……..…..… 66

7.2.4. Достоверност …….. 67

7.2.5. Определяне на референтни граници …… 68

7.3. Верифициране на Human IL-18 ELISA ……..….. 71

7.3.1. Аналитичен обхват (линейност) ……..…..…… 71

7.3.2. Проверка на калибрационната крива ……..…… 72

7.3.3. Невъзпроизводимост ……..…..…… 72

7.3.4. Достоверност 73

7.3.5. Определяне на референтни граници 74

7.4. Представяне на резултатите за uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 като съотношения спрямо уринния креатинин 77

7.5. Приложение на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 81

7.5.1. Пациенти подложени на планова сърдечна операция, включваща кардиопулмонален байпас 81

7.5.2. Пациенти, постъпващи в спешно отделение, с различни клинични прояви 91

8. ОБСЪЖДАНЕ 101

9. ИЗВОДИ 113

10. ПРИНОСИ 115

11. Приложения 117

12. Библиография 131

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).

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Острото бъбречно увреждане представлява внезапно отпадане на филтрационната бъбречна функция. Това води до клиничен синдром, характеризиращ се с бързо намаление на реналната екскреторна функция с натрупване на крайни продукти на азотния метаболизъм [152]. ОБУ е често срещано сериозно състояние, като заболеваемостта и смъртността, свързани с него, не са намалели през последните десетилетия.

ОБУ се развива за няколко часа до дни и се среща най-често при хоспитализирани пациенти [123, 143]. Механизмите в основата на ОБУ включват: намалена способност на бъбрека да екскретира азот-съдържащи отпадни продукти, затруднен транспорт на електролити, неадекватно поддържане на интраваскуларния обем, както и неспособност да се поддържа киселинно-алкалния статус [19]. Клиничният изход зависи от конкретната клинична ситуация, но при всички случаи ОБУ води до повишена заболеваемост и смъртност [66, 21].

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ НА ОСТРОТО БЪБРЕЧНО УВРЕЖДАНЕ

Исхемия-реперфузия обусловено ОБУ

При различни ситуации бъбреците много ефективно поддържат перфузионното налягане и скоростта на гломерулната филтрация чрез авторегулация, при която аферентните и еферентните артериоли реагират на вазоконстрикторни и вазодилататорни фактори [4]. В случай на нарушена авторегулация, каквато е налице

при екстремна обща хипертензия, съдова тромбоза, съдово клампиране или кислородно изчерпване, отговорът се състои във вазоконстрикция и редукция на GFR [85]. Въпреки всичко, значителни периоди на изолирана топла исхемия се толерират от бъбреците без тежко увреждане [23]. Реперфузията, последваща исхемията, също уврежда бъбречната тъкан и този тип увреждане се нарича исхемия-реперфузия обусловено ОБУ.

При нарушена авторегулация, изчерпването на АТР (аденозин трифосфат) следва комплекса от механизми, водещи от исхемия до увреждане. Засягането на еднотела и освобождаването на NO (азотен окис) участва в локалния дисбаланс на вазоактивни субстанции [117]. Тези реакции са придружени от метаболитни промени, активиране на коагулацията [161] и възпалителна реакция [162]. Увреденият съдов ендотел е с повишен пермеабилитет [156] и повишена левкоцитна инфилтрация [169]. Засегнатите бъбречни клетки са с нарушен цитоскелет [187] и освобождават по-голямо количество проинфламаторни и хемотаксични субстанции, засилвайки още повече реакцията [163].

Обструкцията на тубулите от клетъчни фрагменти и обратния поток на гломерулния филтрат към капилярите допълнително допринасят за увреждането [148]. Реперфузионното засягане допълнително уврежда клетките чрез оксидативни процеси. Въпреки всичко повечето тубулни клетки обикновено остават жизнеспособни [177, 157]. В увредените бъбречни клетки се наблюдават както некротични, така и апоптозни процеси [73].

Септично ОБУ

Сепсисът е сред най-честите предразполагащи фактори за развитието на ОБУ при критично болни пациенти. Независимо от ранното предположение, септичното ОБУ е много по-комплексно от исхемия-реперфузия обусловеното. Септичното увреждане е мултифакторно и механизмите, по които възниква, варират значително между отделни пациенти [87, 53]. Все още не е напълно изяснено защо малка част от септичните пациенти имат класическа тубулна некроза, доказана хистопатологично [86], докато всъщност повечето тубулни клетки остават интактни в хода на септично ОБУ.

Животинските модели предлагат значително разнообразие по отношение на връзката между бъбречния кръвоток и системните хемодинамични промени при сепсис [12]. В скорошно проучване са измерени системната хемодинамиката и бъбречния кръвоток с неинвазивни методи при септични пациенти, като се установява постоянно намаление в бъбречния кръвоток в сравнение със сърдечния дебит [142]. Отпадането на GFR при септично ОБУ може да възникне при нормален, а дори и при хипердинамичен бъбречен кръвоток, а нарушената авторегулация води до възникване на дисбаланс между системната хемодинамика и бъбречния кръвоток.

Прекомерната системна възпалителна реакция при сепсис вероятно играе ключова роля за възникването на ОБУ и мултиорганна недостатъчност [54]. Освобождаването на различни възпалителни медиатори от патогените и от имунните клетки индуцира директна интоксикация на тубулните клетки и задейства сложна възпалителна каскада [122].

На клетъчно ниво имуномодулатори като TNFα (тумор некротизиращ фактор α), IL-6 (интерлевкин-6) и левкотриени [79] причиняват апоптоза и дори некроза в тубулните клетки. Освен това възпалителният стимул индуцира освобождаването на NO в отговор на ендотелното увреждане, като причинява смущения в интрареналната хемодинамика [71] и шънтиране в перигломерулната система. Предполага се, че прекомерната дилатация на еферентната артериола в сравнение с аферентната би довело до „локална хипотензия“ в гломерулите и намаление на GFR [106]. В отговор се активира системата RAAA (ренин-ангиотензин-алдостерон) [99], което води до повишена резистентност на бъбречните съдове и намален бъбречен кръвоток.

Оксидативният стрес, митохондриалната дисфункция и микроциркулаторните смущения също имат участие в септичното ОБУ, но ролята на тези механизми не е изяснена.

Нефротоксини

Няколко медикамента и други субстанции, които често се използват в отделенията за интензивни грижи, имат директен или индиректен ефект върху бъбрека. Индиректният ефект може да бъде оказан чрез повлияване на системната хемодинамика или чрез модифициране на фармакокинетиката на други лекарства [132]. Директно увреждане може да възникне по няколко механизма: 1. вазоконстрикция (амфотерицин, калциневринови инхибитори); 2. промяна в гломерулната хемодинамика (нестероидни противовъзпалителни средства, ACE-инхибитори, инхибитори на ангиотензин-конвертиращия ензим); 3. токсично увреждане на тубулите (аминогликозиди, амфотерицин, метотрексат, контрастни

материи); 4. индуциране на интерстициален нефрит (ацикловир); 5. формиране на кристали в дисталния тубул (ацикловир, метотрексат); 6. тромботична микроангиопатия (калциневринови инхибитори); 7. осмотично-индуцирано тубулно увреждане (имуноглобулини, скорбяла) [146].

Повишеното освобождаване на миоглобин при рабдомиолиза също уврежда бъбрека. Механизмите не са напълно изяснени, но вероятно включват интраренална вазоконстрикция, директно и исхемично тубулно увреждане, както и тубулна обструкция [183].

TLS (тумор лизис синдром) е метаболитно усложнение при злокачествени заболявания или в хода на лечение. При TLS продуктите от разпадането на малигнените клетки индуцират хиперкалиемия, хиперфосфатемия, хиперурикемия, хипокалциемия и често предизвикват ОБУ поради кристализация на калциев фосфат и пикочна киселина [68]. Пикочната киселина осъществява по-многостранен ефект посредством вазоконстрикция, нарушена авторегулация, окисление и възпаление [150].

Кардиоренален и хепаторенален синдром

Бъбречното увреждане често възниква вследствие на сърдечна недостатъчност, както и обратното. Това се дължи на системни неврохормонални отговори, редуциран сърдечен дебит, повишено венозно налягане и последваща хипотензия [107, 144].

Физиологичните последствия от острата чернодробна недостатъчност са подобни на тези при сепсис и често водят до ОБУ по различни пътища, включващи хипотензия и ренална исхемия, неврохормонални и имунологични механизми, задръжка на течности

и интраадбоминална хипертензия вследствие от асцита. Комплексната връзка между чернодробната и бъбречната дисфункция се определя като хепаторенален синдром [51, 50].

РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА ОБУ

Оценката на абсолютния риск от бъбречно засягане е почти невъзможна поради изключителната хетерогенност на пациентите, които развиват ОБУ. Като цяло напредналата възраст [109, 140] и женския пол [159] се асоциират с по-висок риск за развитие на ОБУ. Сред хроничните съпътстващи състояния ХБЗ (хронично бъбречно заболяване) е един от факторите, който най-ясно се свързва с повишения риск за ОБУ, дори и при пациентите с лекостепенно повишение на sCreat [8, 26, 47]. Диабетът и сърдечната дисфункция също увеличават податливостта към ОБУ [40]. При сърдечни операции, белодробните и чернодробните съпътстващи заболявания [28, 118] са рискови фактори за ОБУ. Предполага се и наличието на генетични фактори, предразполагащи към развитието на ОБУ [1, 32, 48, 58, 72, 92, 100]. ХБЗ, сепсис, чернодробна недостатъчност, сърдечна недостатъчност и злокачествени заболявания повишават риска от лекарствено-индуцирано ОБУ [132]. Малигнените заболявания могат да доведат до ОБУ посредством директна инвазия към бъбрека, посредством септична инфекция, а също и чрез нефротоксични химиотерапевтични агенти [14]. TLS е метаболитно усложнение при злокачествени заболявания или в хода на лечението им, което често води до ОБУ [68].

Сепсисът е най-честата подлежаща причина за ОБУ, като случаите свързани с него достигат 50% [74, 129].

Използването на HES (хидроксиетил скорбяла) при пациенти в отделения за интензивни грижи може да доведе до влошаване на бъбречната функция. Заключенията от различни мета-анализи показват повишен риск от развитие на ОБУ, свързано с приложението на HES, при критично болни [56, 138, 185]. В сравнение с кристалоидите, прилагането на HES повишава риска за тежко ОБУ и нуждата от бъбречно-заместителна терапия [124].

Ексцесивните вливания на течности също се считат за рисков фактор за ОБУ и неблагоприятен клиничен изход. Механизмите включват абдоминална хипертензия или ACS (абдоминален компартмент синдром) [88, 170] с повишено венозно налягане и венозна конгестия в бъбреците [33, 91].

Обширните операции, по-конкретно сърдечните операции, включващи КПБ, са рискови по отношение развитието на ОБУ поради потенциални промени в хемодинамиката, интраваскуларния обем, доставянето на кислород и системните възпалителни реакции-SIRS (синдром на системния възпалителен отговор) [174].

Близо ¼ от тежките случаи на ОБУ са свързани с лекарствени токсични въздействия [111]. Към потенциалните нефротоксични медикаменти спадат: ACE инхибитори, ацикловир, аминогликозиди, амфотерицин, контрастни материи, калциневринови инхибитори (циклоспорин, тарколимус), диуретици, имуноглобулини, метформин, метотрексат, нестероидни противовъзпалителни средства, пептидогликани (ванкомицин) [2, 179].

ЧЕСТОТА НА ОБУ

По данни на Nickolas et al. към 2012 г. само в САЩ на над 1 милион души годишно се поставя диагноза ОБУ, като броят им нараства, независимо от непрекъснатото подобряване на болничната грижа. По данни на ICNARC (Intensive Care National Adult Research Centre) близо 10% от пациентите в отделения за интензивни грижи са диагностицирани с ОБУ. Заключението на британския NCEPOD (National Confidential Enquiry into Patient Outcome and Death) е, че се отдава твърде малко внимание на детайлите, свързани с ОБУ, което води до неадекватна оценка и недопустимо забавяне в диагностично отношение.

В глобален мащаб от ОБУ са засегнати 5 – 7% от всички хоспитализирани пациенти. Сред критично болните около 6% са тези с изключително тежка увреда, налагаща бъбречнозаместителна терапия [81]. Обикновено ОБУ се диагностицира на база натрупването на крайни продукти от азотната обмяна (урея и креатинин) и/или намалена продукция на урина [11].

Серумният креатинин е късен и ненадежден показател за ОБУ поради редица причини [38]. Нивата му се влияят от редица извънренални променливи като пол, възраст, мускулна маса и метаболизъм, хранителен и хидратационен статус, съпътстваща медикация. Нерядко някои остри и хронични бъбречни състояния могат да се представят без повишение на серумния креатинин, благодарение на компенсаторните възможности на бъбрека- установено е, че серумният креатинин се повишава при отпадане на над 50% от реналната функция. Освен това концентрацията на серумния креатинин не отразява реалното понижение на скоростта

на гломерулната филтрация в острата фаза, тъй като са необходими няколко часа до дни, за да се установи ново равновесие между предполагаемата стабилна креатининова продукция и намалената му екскреция [84].

При тежки заболявания като сепсис измерените стойности на серумен креатинин намаляват и се оказват още по-ниски на фона на хемодилуцията в резултат на целенасочено лечение с вливания на течности. Критично се явява и диференцирането на ОБУ от преренална азотемия или хронична бъбречна недостатъчност в момента на постъпване на пациента с цел навременно предприемане на адекватни терапевтични мерки. Самостоятелното измерване на нивото на серумен креатинин не може да послужи за разграничаване на тези състояния [16].

Не на последно място, повишението на серумния креатинин е късна индикация за функционални промени, касаещи степента на гломерулната филтрация, което забавя оценката на важни структурни промени в бъбреците в ранния стадий на ОБУ. От всичко изброено става ясно, че проследяването на промените в нивото на серумния креатинин е тест с недостатъчна диагностична ефективност за ранно диагностициране на влошена бъбречна функция [27].

Таблица 1. Случаите с летален изход от ОМИ (остър миокарден инфаркт) са намалели с 50% за последните десетилетия благодарение на откриването и въвеждането на нови показатели за некроза на миокарда. Липсата на нови, по-надеждни показатели за ОБУ води до запазена, дори повишена смъртност вследствие ОБУ.

Период	**ОМИ***	**ОБУ****
1960	LDH	Серумен креатинин
1970	CPK, Myoglobin	Серумен креатинин
1980	CPK-MB	Серумен креатинин
1990	Troponin T	Серумен креатинин
2000	Troponin I	Серумен креатинин
	50% ↓ смъртност	**Висока смъртност**

**ОМИ- остър миокареден инфаркт*

***ОБУ- остро бъбречно увреждане*

Към настоящия момент съществуват няколко консенсусни дефиниции на ОБУ. Най-често се използват RIFLE критериите (Risk, Injury, Failure, Loss, End stage) [166], както и техни модификации от AKIN (Acute Kidney Injury Network) [10, 110], като и двете дефиниции вече са валидирани при хиляди пациенти [160]. Международното приемане на тези консенсусни дефиниции за ОБУ сред нефролози, специалисти по интензивни грижи и други професионалисти в сферата на здравеопазването води до напредък по отношение изясняването на епидемиологията, естественото развитие и дългосрочния изход при пациенти с ОБУ [77]. Тези дефиниции стандартизират изследването на ОБУ, утъпкват пътя за последващата лавина от проучвания за нови биомаркери и дават яснота по отношение на факта, че епизоди на ОБУ имат дългосрочни

неблагоприятни последствия за бъбречната функция на пациента [95].

Резултатите от проучвания, които представят смъртността вследствие на ОБУ, са обобщени в таблица 2.

Таблица 2. Обобщение на резултатите от оригинални статии относно заболеваемостта и смъртността от ОБУ.

Автор	брой пациенти	едноцентрово/ мултицентрово	пациентска група	ОБУ дефиниция	ОБУ случаи (%)	смъртност (%)
Thakar et al.,2009 [158]	325,395	мулти	смесена*	RIFLE	22	10.9
Ostermann, Chang,2007 [129]	41,972	мулти	смесена*	RIFLE	35.8	10.2 12.9
Gammelager et al.,2012 [49]	30,762	мулти	смесена*	RIFLE	15.6	40
Joannidis et al.,2009 [75]	16,784	мулти	смесена*	RIFLE	35.5	36.4
Hoste et al., 2006 [67]	5383	мулти	смесена*	RIFLE	67.2	13.3
Cruz et al., 2007 [30]	2164	мулти	смесена*	RIFLE	10.8	36.3
Piccinni et al.,2011 [140]	576	мулти	смесена*	RIFLE	42.7	29
Abosaif et al.,2005 [3]	183	едно	смесена*	RIFLE		47.5
Yegenaga et al.,2010 [182]	139	едно	смесена*	RIFLE	56.8	37.4
Lopes et al., 2007 [98]	182	едно	сепсис	RIFLE	37.4	37.4

Lerolle et al.,2006 [89]	35	едно	септичен шок	RIFLE	65.8	62.8
Coca et al., 2007 [25]	304	едно	изгаряния	RIFLE	26.6	7.6
Lopes et al., 2007 [97]	126	едно	изгаряния	RIFLE	35.7	17.5
Palmieri et al.,2010 [130]	60	едно	изгаряния	RIFLE	53.3	34.4
Bagshaw et al.,2008 [7]	9449	мулти	травма	RIFLE	18.1	16.7
Englberger et al., 2013 [44]	951	едно	операция трикуспидална клапа	RIFLE	30	5.5
Englberger et al.,2011 [45]	851	едно	операция гръдна аорта	RIFLE	17.7	1.3
Kuitunen et al.,2006 [83]	813	едно	сърдечна операция	RIFLE	19.3	3.2
Yan et al., 2009 [181]	509	едно	сърдечна операция	RIFLE	32.8	4.3
Machado et al.,2009 [101]	817	едно	КПБ**	RIFLE	48.5	12.6
Sirvinskas et al.,2008 [155]	179	едно	КПБ**	RIFLE	10.6	НД***
Cholongitas et al.,2009 [22]	412	едно	цироза	RIFLE	50	61.2
Hata et al., 2010 [63]	376	едно	ОДСН****	RIFLE	73.1	10.5

** смесена: комбинирани медицински и хирургични пациенти*
*** КПБ: кардиопулмонален байпас*
**** НД: няма данни*
***** ОДСН: остра декомпенсирана сърдечна недостатъчност*

Липсата на чувствителни и специфични биомаркери за ранна детекция на ОБУ силно затруднява диагностицирането и лечението на тези пациенти и има пагубен ефект върху терапевтичното поведение и клиничния изход от ОБУ [62]. Забавянето в диагностицирането на ОБУ, базирано на промяната в нивото на серумния креатинин, се явява сериозен проблем, тъй като при някои проучвания върху животни са установени редица интервенции, които могат да предотвратят и излекуват ОБУ, ако се приложат достатъчно рано в хода на заболяването, а именно-преди да започне повишението на серумния креатинин [39].

Като се имат предвид ограниченията на серумния креатинин, търсенето на по-надеждни биомаркери за ОБУ е от особен интерес на съвременната медицина.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИДЕАЛНИТЕ БИОМАРКЕРИ ЗА ОБУ

Идеалните биомаркери за ОБУ трябва да са достъпни, бързи и измерими, прецизни и точни както в диагностично и прогностично отношение, така и да определят тежестта на реналната дисфункция, да са специфични за бъбрека, да се повишават в ранния стадий на ОБУ, с висока чувствителност и специфичност [5].

По отношение характеристиките на изследването биомаркерите за ОБУ трябва да са неинвазивни, лесни и бързи за определяне до леглото на болния или в стандартна клинична лаборатория, ползвайки лесно достъпни материали като кръв или

урина. Повечето от така описаните биомаркери за ОБУ вече са изследвани в урина. Определянето в урина има някои предимства, в това число неинвазивния характер на взимане на пробата, редуцирания брой интерфериращи протеини, както и потенциала за разработване на удобни комплекти за самотестуване от пациентите. Съществуват и недостатъци, включващи невъзможността да се вземе биологичен материал от пациенти с тежка олигурия, както и потенциалните промени в концентрацията на показателите във връзка с хидратационния статус и диуретичната терапия. От друга страна плазмените концентрации могат да покажат подвеждащи стойности поради екстраренални причини, а също и при субклинични промени в бъбречната екскреция.

По отношение на диагностичните качества биомаркерите за ОБУ трябва да притежават висока диагностична чувствителност и широк динамичен обхват, който позволява стратификация на риска. Трябва да бъдат високоспецифични за ОБУ, да могат да идентифицират различните му степени, както и да разграничат ОБУ от хронично бъбречно заболяване.

В идеалния случай биомаркерите трябва да могат да дадат и насоката за определяне на точното място на първичната увреда (проксимален тубул, дистален тубул, интерстициум, съдова мрежа), както и етиологията (исхемия, токсини, сепсис или комбинация от фактори).

В прогностично отношение биомаркерите за ОБУ трябва да могат да дадат представа за стратификацията на риска (продължителност и тежест на ОБУ), да предвидят тежките усложнения (бъбречнозаместителна терапия, продължителност на

болничния престой, смъртност), както и динамично да проследяват отговора при различни интервенции. Биомаркерите, асоциирани с ясна биологична роля и установени патофизиологични механизми в хода на ОБУ, в най-голяма степен биха задоволили желаните диагностични и прогностични характеристики.

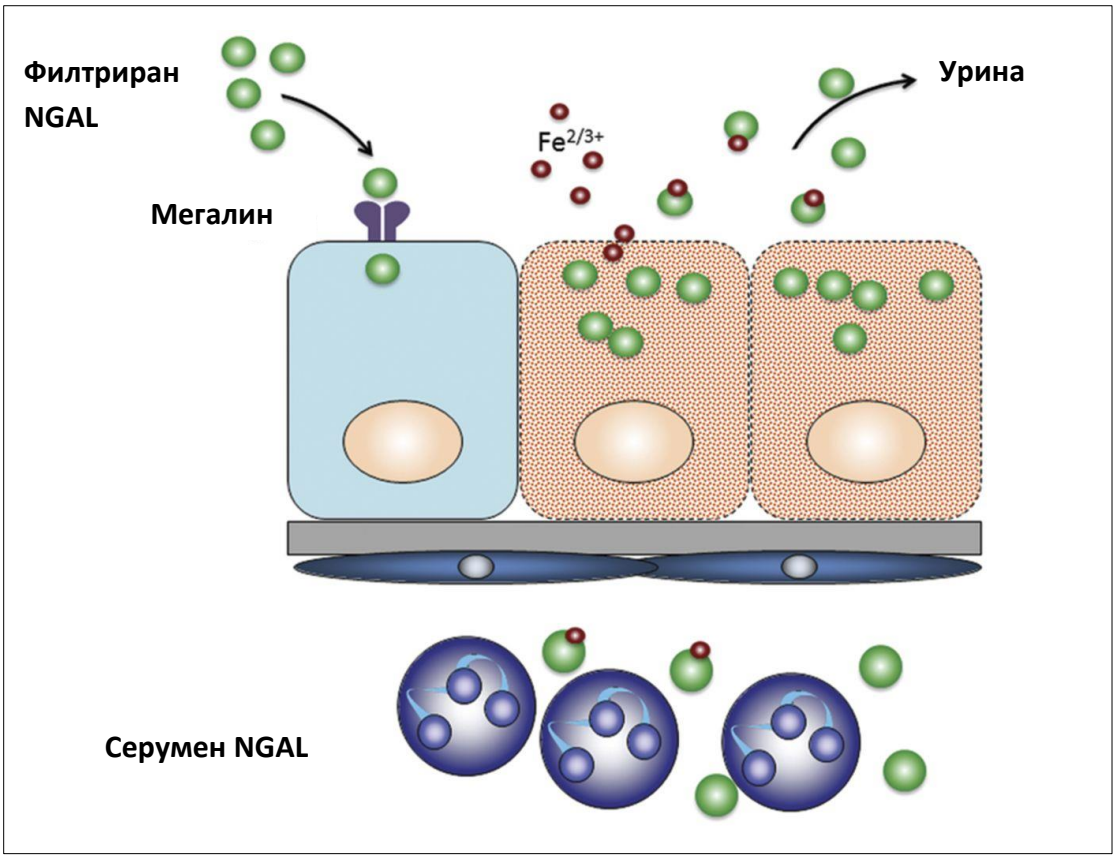
През последното десетилетие по-доброто разбиране на ранния патофизиологичен отговор на бъбрека към стресови фактори откри редица гени и протеини, които бързо се индуцират в бъбрека [39]. Те участват в регулацията на нови пътища и механизми, които модулират бъбречната увреда. За щастие някои от тези бъбречни протеини са открити в урината и/или плазмата, очертавайки се като ранни неинвазивни биомаркери за ОБУ и неговия клиничен изход.

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 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).

НЕУТРОФИЛЕН ГЕЛАТИНАЗА-АСОЦИИРАН ЛИПОКАЛИН (NGAL)

NGAL представлява 25 kDa протеин, първоначално изолиран от човешки неутрофили и впоследствие описан като 25 kDa протеин, свързан ковалентно с неутрофилната гелатиназа [78]. Принадлежи към семейство малки белтъци (липокалини), ангажирани с трансмембранния транспорт на липофилни съединения [76]. При зрелите периферни неутрофили липсва NGAL mRNA експресия. Синтезира се в ранния миелоцитен стадий на гранулопоезата, по време на формирането на вторичните гранули. NGAL mRNA нормално се експресира в различни тъкани у възрастния индивид, в това число костен мозък, простата, слюнчени жлези, стомах, дебело черво, трахея, бял дроб, черен дроб и бъбрек [38]. Някои от тези тъкани често са изложени на влиянието на микроорганизми и експресират ниски нива на NGAL протеин. Промоторният участък на NGAL гена притежава свързващи места за редица транскрипционни фактори, включително NF-kB. Това би могло да обясни както нормалната, така и индуцираната експресия на NGAL в някои тъкани, които не са свързани с хемопоезата. Подобно на други липокалини, NGAL е с бъчвообразна терциерна структура с хидрофобна опашка, която свързва малки липофилни молекули. Основните лиганди за NGAL са сидерофорите- малки желязо-свързващи молекули [52]. NGAL съдържа критичен компонент на вродения имунитет срещу бактериална инфекция, за което свидетелстват експериментални доказателства от генетично модифицирани мишки с липсващ ген за NGAL, което ги прави по-податливи на Грам-отрицателни бактериални инфекции и смърт вследствие на сепсис.

От друга страна, сидерофорите, продуцирани от еукариоти, участват в NGAL-медиирания транспорт на желязо [24], което е решаващо по отношение на различни клетъчни отговори като пролиферация и диференциация. По време на формирането на бъбреците NGAL подпомага епителното диференциране на мезенхимните прогениторни клетки, което води до създаването на гломерули, проксимални тубули, бримка на Хенле и дистални тубули. Въпреки това се наблюдава подчертана експресия на NGAL в увредени епителни клетки както в бъбрека, така и в дебелото черво, черния дроб, белите дробове. Това вероятно е медиирано от NF-kB, за който се знае, че се активира много бързо в епителни клетки след остра увреда и има важна роля в контролирането на клетъчното оцеляване и пролиферация. В контекста на увреден напълно развит орган, какъвто е бъбрекът, биологичната роля на NGAL е свързана със запазването на функцията, забавяне на апоптозата, както и усилен пролиферативен отговор [116, 119]. Този протективен ефект зависи от хелацията на токсичното желязо от извънклетъчната среда и регулирания пренос на сидерофори и желязо към интрацелуларното пространство. Не е изненадващо, че проучванията на генната експресия при ОБУ показват бързо и мощно повишение на NGAL mRNA в дисталните сегменти на нефрона, по-специално в плътния възходящ край на бримката на Хенле и събирателните каналчета. Последващият синтез на NGAL протеин в дисталния нефрон и секрецията в урината формират основната част от уринния NGAL.



Фигура 1: Филтрираният NGAL се залавя от проксималните тубулни клетки посредством мегалин (повърхностен рецептор със силна експресия в апикалния участък на епителните клетки в проксималния тубул) и нивата му се повишават в серума и в урината. *Charlton et al. NDT (2014).*

Въпреки че плазменият NGAL свободно се филтрира през гломерула, той в голяма степен се реабсорбира в проксималния тубул. Това означава, че екскрецията на NGAL вероятно се дължи на бъбречна увреда със засягане на реабсорбцията в проксималния тубул и/или индуциране на синтеза de novo на NGAL в дисталния тубул. По отношение на плазмения NGAL самият бъбрек не се явява основен източник. NGAL протеинът в кръвообращението произхожда и от други органи, каквито са черният дроб и белите дробове, а също и от активирани неутрофили, макрофаги и други клетки на имунната система. Освен това всяко намаление на степента на гломерулна

филтрация намалява екскрецията на NGAL с последващо повишение в системното кръвообращение при пациенти с хронична бъбречна увреда. Предклинични проучвания върху животински модели определят NGAL като един от белтъците с най-висока индукция в бъбрека много скоро след остро увреждане [59]. Последващите протеомни анализи при животни определят NGAL като отличен биомаркер за ранно диагностициране, терапевтично мониториране и прогноза при често срещани случаи на ОБУ [102]. Всичко това вдъхновява редица транслиращи проучвания при хора, които демонстрират NGAL като отличен биомаркер в урината и плазмата за ранна диагноза, терапевтично мониториране и прогноза при ОБУ. Разработването на стандартизирани клинични платформи за бързо и точно измерване на NGAL в урината и плазмата допълнително улеснява широкото използване и валидиране на NGAL като биомаркер [37].

NGAL се очертава като един от най-обещаващите биомаркери от ново поколение както в клиничната нефрология, така и отвъд нея [15]. При проучване сред пациенти с установена ОБУ (с удвоени нива на серумен креатинин) с различна етиология се открива значително повишение на NGAL в серума и урината в сравнение със здрави контроли [119]. Нивата на уринния и серумния NGAL корелират с тези на серумния креатинин, а бъбречната биопсия показва интензивно натрупване на имунореактивен NGAL като чувствителен показател за установена ОБУ при хора. Най-добре е проучено поведението на NGAL при пациенти, при които ОБУ е очаквано усложнение.

Сърдечните операции, протичащи с екстракорпорално кръвообращение, каквато е кардиопулмоналният байпас (КПБ), са

сред най-често извършваните хирургични интервенции в болниците по света. В около 30% от случаите пациентите развиват постоперативно ОБУ с различна тежест, което е свързано със значително увеличение на неблагоприятните последствия и смъртността. Патогенезата на ОБУ вследствие сърдечна операция включва няколко механизма- наслагване на хемодинамични, възпалителни и нефротоксични фактори, което води до засягане на бъбрека [145].

Редица проучвания са фокусирани върху предиктивната стойност на NGAL, измерен в първите 2 – 6 часа след съдовата анастомоза, при пациенти, подложени на КПБ. Стойностите на NGAL се сравняват с тежестта на ОБУ според критериите, включени в RIFLE класификацията (Risk, Injury, Failure, Loss, End stage), като AUC-ROC показва по-добри стойности за разграничаване на категорията ОБУ: R (0.72), I (0.79) и F (0.80)- Таблица 3. Тъй като RIFLE критериите се основават главно на повишението на серумния креатинин спрямо изходните стойности, забавянето в промяната на този функционален показател средно с 1 – 3 дни след структурната увреда, нерядко може да бъде фатално в диагностично и терапевтично отношение. Освен това предиктивната роля на уринния NGAL след сърдечна операция спрямо изходната бъбречна функция дава най-показателни вариации при пациенти с нормална предоперативна бъбречна функция [108, 104]. Още по-показателни са резултатите при деца, където отсъстват съпътстващи променливи като възраст, предшестващо бъбречно заболяване, удължено време за осъществяване на байпас, хронично заболяване или диабет.

Таблица 3. NGAL за ранна диагноза на ОБУ след сърдечна операция.

	Пациенти	**ОБУ* случаи**	**Материал**	**AUC**	**Sens.****	**Spec.*****	**Дефиниция за ОБУ**
[115]	71	20	Урина	0.99	100	98	RIFLE R или по-висок
[172]	81	16	Урина	0.80	73	78	RIFLE R или по-висок
[13]	196	99	Урина	0.95	82	90	RIFLE R или по-висок
[80]	72	34	Урина	0.71	67	58	RIFLE R или по-висок
[171]	426	85	Урина	0.61	39	78	RIFLE R или по-висок
[94]	103	13	Урина	0.50	67	11	RIFLE R или по-висок
[20]	30	15	Урина	0.85	84	80	RIFLE R или по-висок
[82]	374	112	Урина	0.92	85	86	RIFLE R или по-висок
[81]	220	60	Урина	0.90	88	83	RIFLE R или по-висок
[135]	311	53	Урина	0.71	42	85	Удвоени нива на Creat
[134]	1219	60	Урина	0.67	46	81	Удвоени нива на Creat
[115]	71	20	Плазма	0.90	50	100	RIFLE R или по-висок
[35]	120	45	Плазма	0.96	84	94	RIFLE R или по-висок
[57]	100	23	Плазма	0.80	79	78	RIFLE R или по-висок
[141]	30	8	Плазма	0.98	100	91	RIFLE R или по-висок
[139]	879	75	Плазма	0.64	39	82	RIFLE R или по-висок
[82]	374	112	Плазма	0.94	90	88	RIFLE R или по-висок
[135]	311	53	Плазма	0.56	27	81	Удвоени нива на Creat
[134]	1219	60	Плазма	0.70	50	82	Удвоени нива на Creat
Общо	**6207**	**1076**	**Средно**	**0.79**	**68%**	**80%**	

**ОБУ- остро бъбречно увреждане*

***Sens.- чувствителност*

****Spec.- специфичност*

При пациенти, постъпващи в спешно отделение с множествени травми, ОБУ е често срещано усложнение, обуславящо 40 – 60% от смъртността. Проучвания при критично болни новородени също показват висок процент на ОБУ и неблагоприятен клиничен изход [6].

Няколко проучвания сред критично болни възрастни са фокусирани върху измерването на плазмения и уринния NGAL [29, 31, 34, 43, 103, 105, 128, 149, 151, 153, 165]. Уринният NGAL, получен при постъпване на пациенти с множествени травми, прогнозира последващо ОБУ с изключителна AUC-ROC 0.98 [103]. Проучвания в педиатрично интензивно отделение също демонстрират предиктивната роля на повишения NGAL за развитието на ОБУ около 2 дни преди повишението на серумния креатинин, с висока чувствителност и AUC-ROC 0.68 – 0.78 [178, 184]. Въпреки хетерогенността на популацията пациенти в отделенията за интензивно лечение, различната етиология на ОБУ, както и неясния момент на първоначалната увреда, анализът на 14 публикувани проучвания силно подкрепя използването на NGAL за прогнозиране на ОБУ сред популация от критично болни с обща чувствителност 76%, специфичност 87% и средна AUC 0.85.

Таблица 4. NGAL за ранно предвиждане на ОБУ при критично болни.

	Пациенти	**ОБУ* случаи**	**Мареriал**	**AUC**	**Sens.****	**Spec.*****	**Дефиниция за ОБУ**
[184]	140	106	Урина	0.78	54	97	RIFLE R или по-висок
[165]	204	102	Урина	0.89	80	96	RIFLE R или по-висок
[126]	635	30	Урина	0.95	90	100	RIFLE R или по-висок
[103]	31	11	Урина	0.98	91	95	RIFLE R или по-висок
[105]	44	18	Урина	0.86	71	100	RIFLE R или по-висок
[34]	632	171	Урина	0.88	89	70	RIFLE R или по-висок
[43]	529	147	Урина	0.66	40	80	RIFLE R или по-висок
[153]	145	75	Урина	0.87	88	89	RIFLE R или по-висок
[127]	1635	96	Урина	0.81	68	81	RIFLE R или по-висок
[29]	88	42	Плазма	0.92	82	97	RIFLE R или по-висок
[128]	45	24	Плазма	0.79	68	82	RIFLE R или по-висок
[31]	307	133	Плазма	0.78	73	81	RIFLE R или по-висок
[105]	44	18	Плазма	0.85	83	86	RIFLE R или по-висок
[34]	632	171	Плазма	0.86	82	70	RIFLE R или по-висок
Общо	**5111**	**1144**	**Средно**	**0.85**	**76%**	**87%**	

**ОБУ- остро бъбречно увреждане*

***Sens.- чувствителност*

****Spec.- специфичност*

Предимства и недостатъци на NGAL като биомаркер за ОБУ

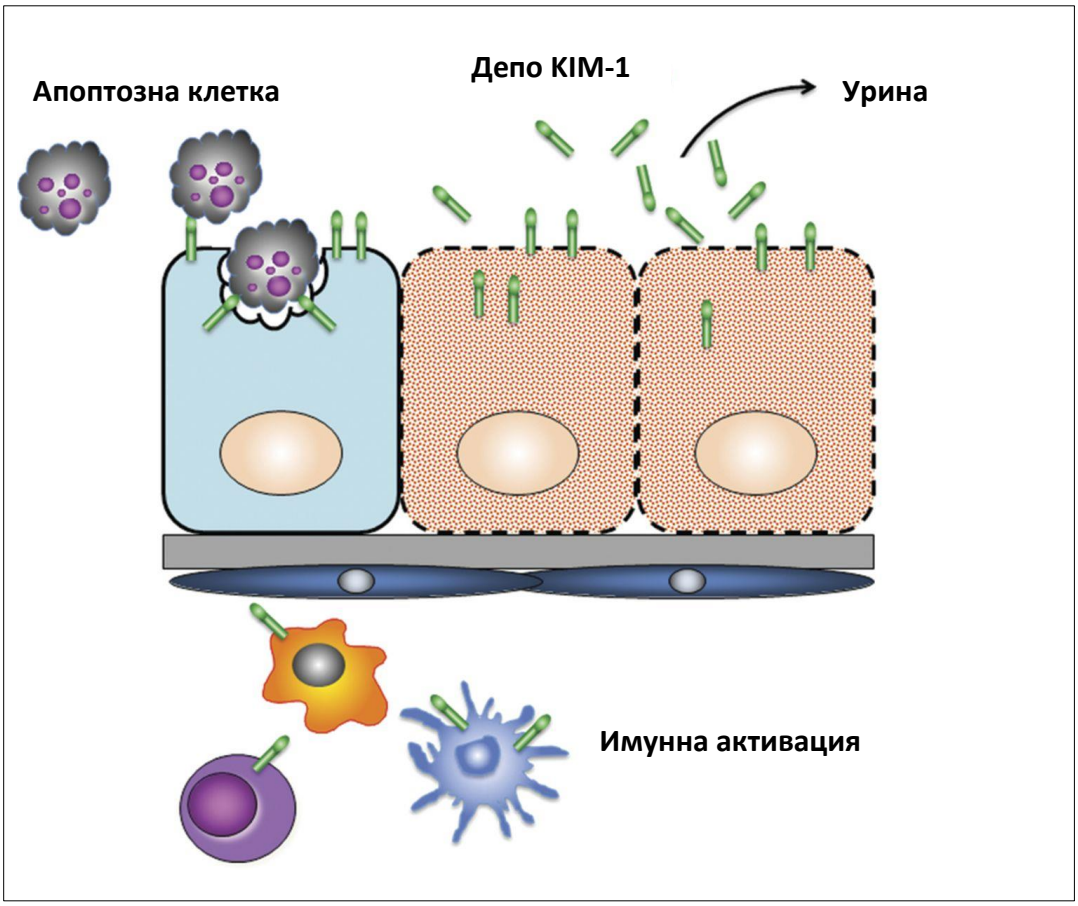
Публикуваните проучвания до момента показват, че NGAL представлява нов предиктивен биомаркер за ОБУ и изхода от него. Въпреки това NGAL се оказва най-чувствителен и специфичен показател при хомогенни пациентски популации с предсказуеми форми на ОБУ. Мета-анализите също показват, че възрастта може да бъде фактор, променящ представянето на NGAL като биомаркер за

ОБУ, с по-добри предиктивни възможности при деца (обща AUC-ROC 0.93), отколкото при възрастни (AUC-ROC 0.78). Определянето на плазмен NGAL може да бъде повлияно от редица съпътстващи променливи като хронично бъбречно заболяване, хронична хипертензия, системни инфекции, възпалителни заболявания, анемия, хипоксия и злокачествени заболявания. При пациентите с хронични бъбречни заболявания нивата на плазмения и уринния NGAL са повишени и корелират с тежестта на бъбречното увреждане. Въпреки това трябва да се отбележи, че повишението на NGAL в тези случаи е много по-малко, отколкото обикновено се открива при ОБУ. Уринният NGAL се оказва и ранен биомаркер за определяне степента на хронична увреда при пациенти с IgA нефропатия и лупусен нефрит, а също може да се повиши и при инфекции на уринарния тракт. И в тези случаи нивата на уринния NGAL са значително по-ниски в сравнение с тези, които типично се измерват при ОБУ.

МОЛЕКУЛА ЗА БЪБРЕЧНО УВРЕЖДАНЕ-1 (KIM-1)

KIM-1 представлява трансмембранен тубулен белтък с недобре изяснени функции. Структурата му предполага, че той има адхезионни свойства [9]. KIM-1 придава на епителните клетки способността да разпознават и фагоцитират мъртви клетки, каквито се откриват в постисхемичен бъбрек и допринасят за обструкцията на тубулния лумен, което е характерно за ОБУ [18]. Предполага се, че експресията му в регенериращ бъбрек представлява активен механизъм, който позволява на дедиференцираните регенераторни клетки да се прикрепят към оголени участъци от базалната мембрана, възстановявайки един непрекъснат епителен слой [9].

Нормално не се експресира в бъбрека, но подчертано се индуцира в условия на експериментално бъбречно увреждане [168]. Идентифициран е като фосфатидилсеринов рецептор, който трансформира епителните клетки във фагоцити, разпознавайки клетъчни повърхностноспецифични епитопи, експресирани от апоптозния тубулен епител [70].



Фигура 2: Депата KIM-1 от проксималните тубулни клетки постъпват в урината. Наблюдава се висока екскреция скоро след исхемичната увреда. *Charlton et al. NDT (2014).*

KIM-1 се открива рано в хода на тубулно увреждане при бъбречна биопсия [186], а също така и в урината. Подчертано високите му нива в урината предшестват появата на цилиндри [60].

Той е обещаващ биомаркер за ранна диагноза на ОБУ и неговия клиничен изход [17].

При хоспитализирани пациенти с установена ОБУ нивата на KIM-1 в урината имат прогностично значение по отношение на неблагоприятния клиничен изход, каквито са нуждата от диализа и смъртността.

В хода на проучване сред 201 пациенти с клинично установено ОБУ са докладвани повишени нива на KIM-1, които значително корелират с клиничния изход, в това число смърт и необходимост от диализа, след уточняване на тежестта на заболяването и съпътстващите болести [93].

При деца, подложени на кардиопулмонален байпас, които са развили ОБУ 1 – 3 дни след операцията, концентрациите на KIM-1 в урината значително се повишават в рамките на 12 часа след съдовата анастомоза [61, 81].

В проучване сред критично болни възрастни с ОБУ нивата на KIM-1 са значително повишени в сравнение със здрави контроли [88]. KIM-1 също е отличен маркер за нефротоксичност в предклинични проучвания [164].

KIM-1 в урината се повишава и при редица хронични бъбречни заболявания и е независим предиктивен маркер за хронична загуба на графта при реципиенти с бъбречен трансплантант [167]. При оцветяване на тъканни проби от 102 пациенти, подложени на бъбречна биопсия в контекста на различни бъбречни заболявания, се открива позитивна оцветка за KIM-1 в недиференцирани клетки на проксималния тубул, корелираща с тубулоинтерстициалната фиброза

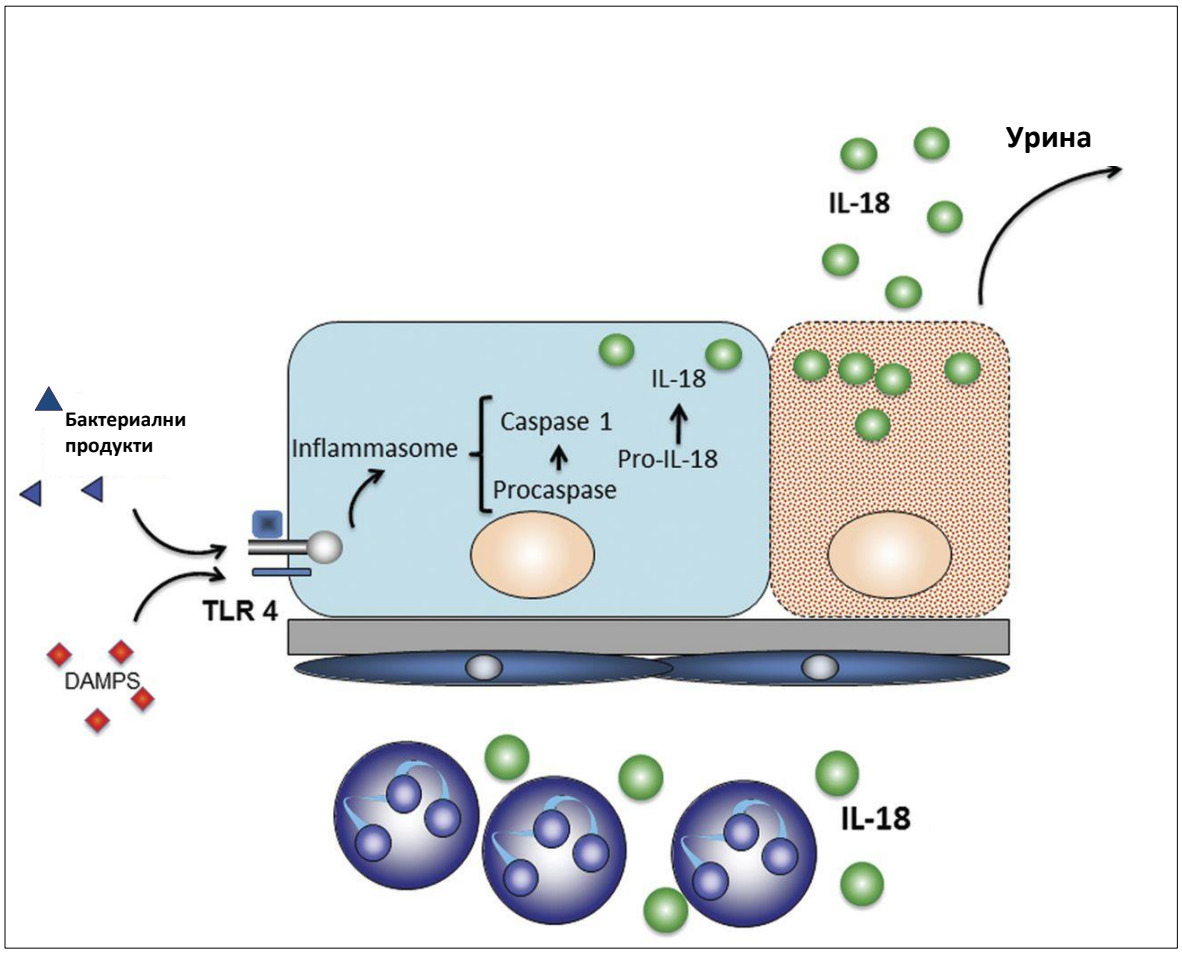
и възпаление. В подгрупата от пациенти, от които са взети и уринни проби около момента на извършване на биопсията, се наблюдава корелация между уринните нива на KIM-1 и тъканната му експресия [168].

KIM-1 се явява рецептор за мъртва материя върху бъбречните епителни клетки, който превръща нормалната клетка на проксималния тубул във фагоцит. Експресията му е неизмерима в нормалните клетки на проксималния тубул, но подчертано се повишава при нараняване или дедиференциране. Има висока експресия в апикалния край на клетката и широката му външна част остава прикрепена и стабилна, когато се екскретира в урината. Присъствието на KIM-1 в урината е високо специфично за бъбречно увреждане, тъй като никой друг орган не показва такава експресия, която да повлияе бъбречната екскреция. FDA и EMEA включват KIM-1 в малкия списък с показатели за бъбречно увреждане, които да се имат предвид при оценката на бъбречното засягане в процеса на разработване на нови лекарствени средства [46].

ИНТЕРЛЕВКИН-18 (IL-18)

Интерлевкин-18 (IL-18) е провъзпалителен цитокин, познат медиатор на възпалението, индуциран в проксималния тубул, който се активира от каспаза-1 [95]. В проучвания при животни е изследвана ролята му при исхемично ОБУ [64, 65, 112, 113, 175, 180]. Демонстрира се, че каспаза-1 медиираната продукция на IL-18 има пагубна роля при ОБУ [41]. Той се екскретира в урината от увредения

бъбрек аналогично с тропонина, който се отделя от увредените миокардни клетки след инфаркт на миокарда.



Фигура 3: Двойно по-високи нива на IL-18 в урината при ОБУ. *Charlton et al. NDT (2014).*

DAMPs (Damage-associated molecular pattern)- молекули, които имат способността на инициират и поддържат имунен отговор при неинфекциозен възпалителен процес;
TLR 4 (toll-like receptor) - улавя липополизахаридите от Грам-негативните бактерии, което е ключово при активирането на вродения имунитет.

IL-18 се явява се по-чувствителен и по-специфичен ранен показател за ОБУ в сравнение със серумния креатинин [42]. В проучване сред пациенти с установена ОБУ нивата на IL-18 в урината са значително повишени, но не и при болни с инфекция на

уринарния тракт, хронични бъбречни заболявания, нефрозен синдром и преренална азотемия [136].

Уринният IL-18 чувствително се повишава преди серумния креатинин при пациенти с остър респираторен дистрес синдром, които впоследствие развиват ОБУ [133]. При деца, подложени на кардиопулмонален байпас, развили впоследствие ОБУ, нивата на уринния IL-18 се повишават около 6 часа след КПБ, с пик на 12-ия час и стойности над 25 пъти по-високи от изходните. Измерванията на IL-18 на 6-ия час предвиждат последващо развитие на ОБУ с AUC 0.75 – 0.84 [81, 137].

При бъбречни трансплантации уринният IL-18 е отличен предиктивен биомаркер за ОБУ и в педиатрични отделения за интензивна грижа, където се оказва предиктивен по отношение на това усложнение около 2 дни преди повишението на серумния креатинин [176]. Ранните стойности на IL-18 в урината корелират с тежестта на ОБУ и със смъртността. В две проспективни мултицентрови проучвания сред деца [135] и възрастни [134], подложени на сърдечна операция, IL-18 се очертава като отличен предиктор за тежестта на ОБУ, както и за неблагоприятния клиничен изход (удължен болничен престой, повишен риск от диализа и смърт). Като цяло IL-18 се оказва по-специфичен за исхемично ОБУ и до голяма степен не се повлиява от хронично бъбречно увреждане или инфекция на уринарния тракт.

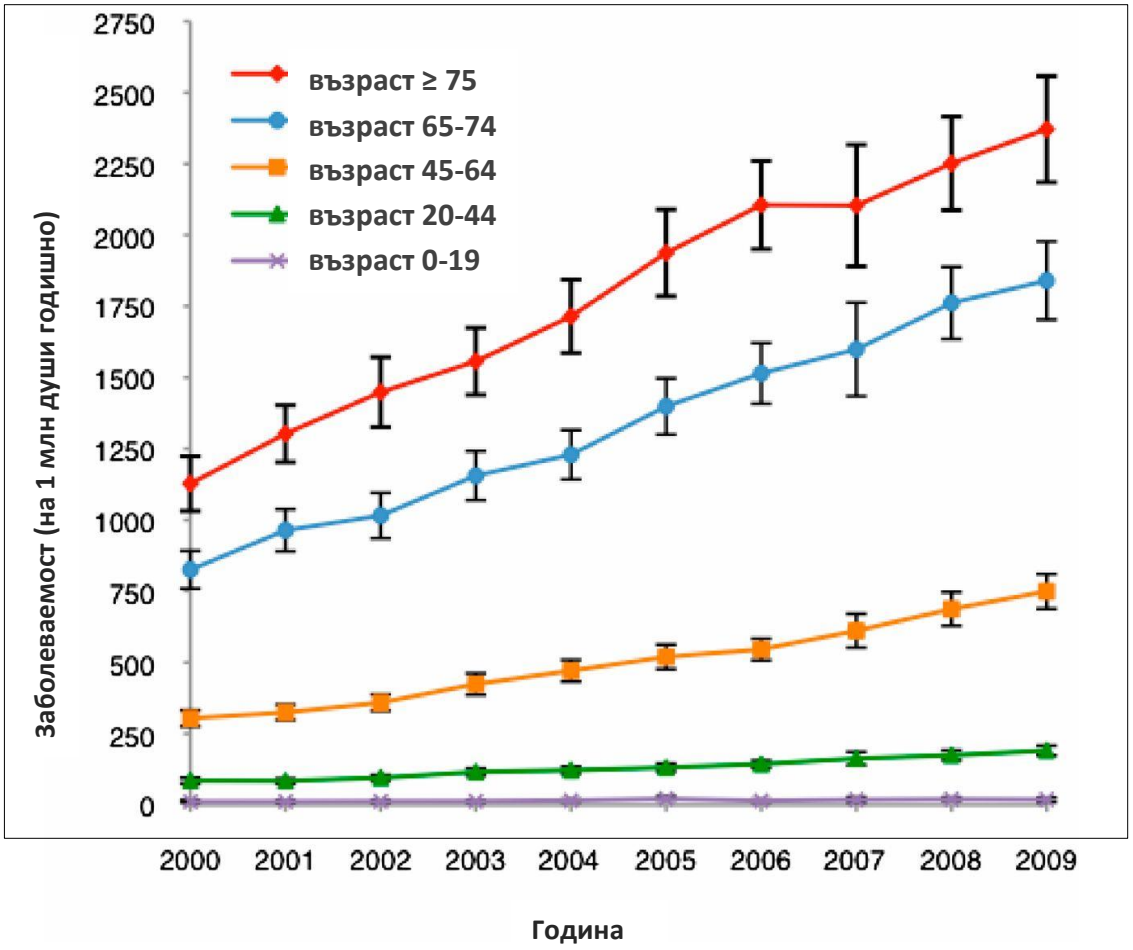
Методи за определяне

Използването на имуноблот-базирани методи за определяне на ранните показатели за ОБУ е ограничено основно заради времето

за извършване и вариациите в условията на анализа. Разработването и валидирането на ELISA процедури за количествено определяне на NGAL, KIM-1 и IL-18 води до значителен напредък в тази област [62]. За NGAL, като най-добре проучения към момента биомаркер, са въведени и автоматични методи за определяне, какъвто е имунохемилуминесцентният анализ с микрочастици (BioPorto Diagnostics, Abbott Architect).

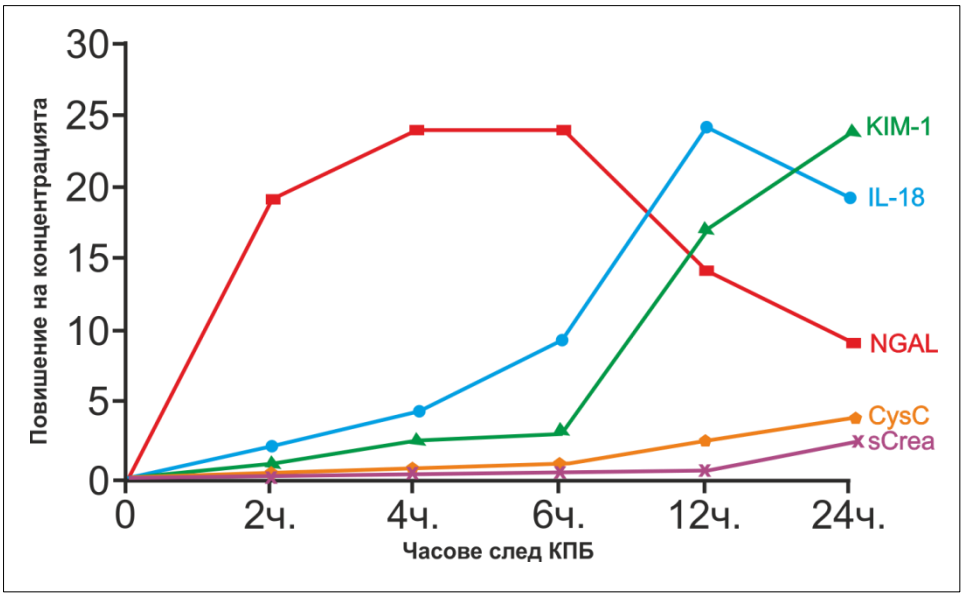
ОБОБЩЕНИЕ

Острото бъбречно увреждане е изключително сериозно състояние с тежки медицински, социални и икономически последствия. Въпреки непрекъснатото подобряване на здравните грижи и въвеждането на модерни технологии в медицината, заболеваемостта и смъртността вследствие ОБУ дори се увеличават в глобален мащаб.



Фигура 4. Заболеваемост от ОБУ при различни възрастови групи в периода 2000 – 2009 г. *(Hsu et al , JASN 2013).*

Сериозността на проблема налага търсене на нови биомаркери за оценка на бъбречното здраве, които да допълнят традиционните показатели. За съжаление серумният креатинин не е достатъчно чувствителен и специфичен за ОБУ, а късното му повишаване води до критично забавяне в прилагането на адекватни профилактични и терапевтични интервенции. Диагностицирането на ОБУ въз основа промените в концентрацията на серумен Cystatin C също е свързано със закъснение след първичната структурна увреда, макар и не толкова голямо, както при серумния креатинин. Най-добре това е онагледено при пациенти, при които ОБУ е очаквано усложнение.



Фигура 5. Повишение на структурните и функционалните показатели (в пъти) след първичната увреда *(Devarajan P, Clin Lab Int 2009).*

За да се осигури най-пълна диагностична и прогностична информация в конкретни случаи, вероятно ще е необходимо разработването на панел, включващ комбинация от няколко показатели. Определянето на времевата последователност на

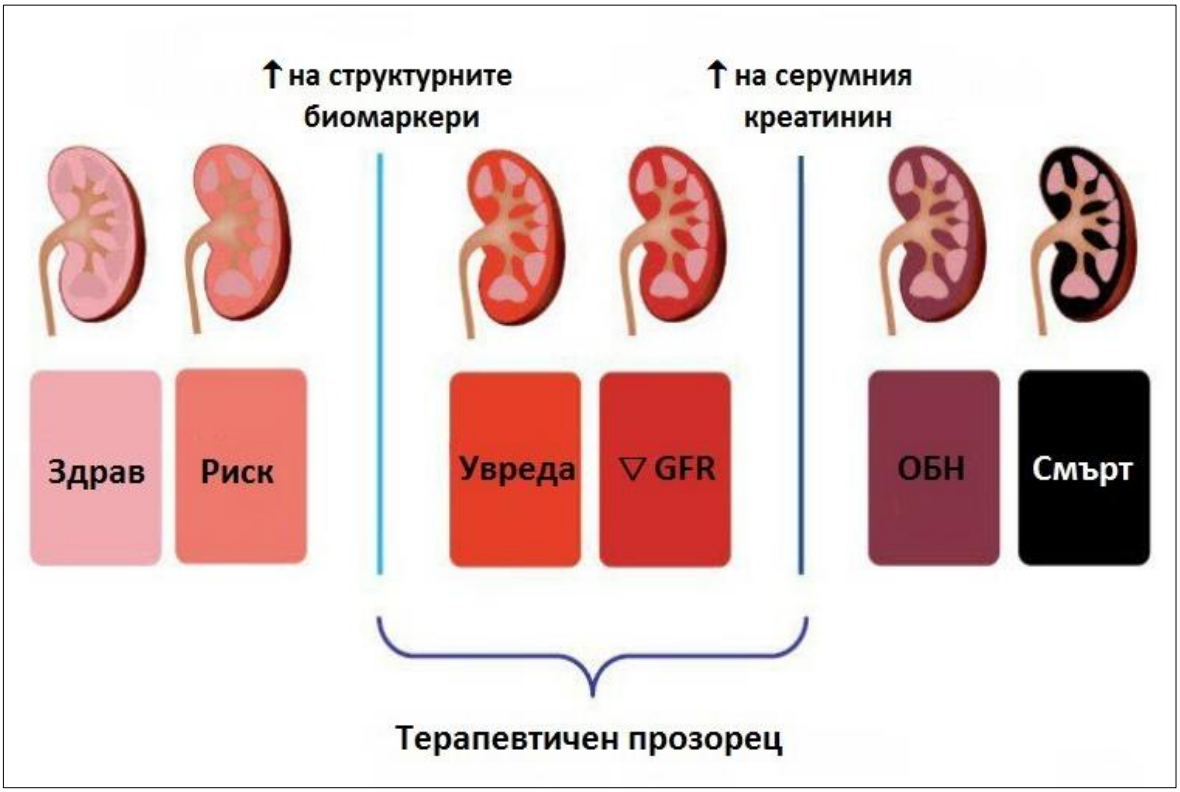
биомаркерите е особено важно и с оглед на това, че експерименталното ОБУ протича в 4 фази: начало, разгръщане, поддържане и възстановяване [39].

Началната фаза е период, през който възниква първото излагане на исхемичната увреда, задълбочава се изчерпването на вътреклетъчния АТФ и се инициира образуването на кислородни реактивни молекули и нестабилно желязо. Особено ефективни в тази фаза могат да бъдат вазодилататори, АТФ донори, антиоксиданти и хелация на желязото, а позитивирането на най-ранните неинвазивни биомаркери като NGAL може да се използва за започване на такава терапия.

Удължаването на периода на исхемия, последван от реперфузия, води до протрахиране на тази фаза. Тубулите претърпяват реперфузия-медиирана клетъчна смърт, а увредените ендотелни и епителни клетки засилват възпалителните каскади. Тази фаза вероятно отключва вратичка с възможности за ранно диагностициране и с помощта на междинни биомаркери като IL-18, както и за активни терапевтични интервенции посредством антиапоптозни и противовъзпалителни стратегии.

По време на поддържащата фаза едновременно се случват процеси на клетъчна увреда и регенерация. Най-ефективни в тази фаза могат да се окажат прилагането на растежен фактор и стволови клетки, ускоряващи процесите на ендогенна регенерация, инициирани от по-късни биомаркери с висока специфичност като KIM-1.

В тази бързоразвиваща се научна област, с провеждането на функционални геномни и протеомни анализи, могат да бъдат открити допълнителни биомаркери, които да доведат до още по-сериозен напредък в близко бъдеще [36].



Фигура 6. Повишението на структурните показатели за ОБУ предшества функционалните промени в бъбрека, давайки възможност за ранна диагноза и адекватен терапевтичен подход *(Lewington et al., Kidney Int, 2013).*

ЦЕЛ НА ПРОУЧВАНЕТО

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) [90] 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◦С до извършване на анализа.

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

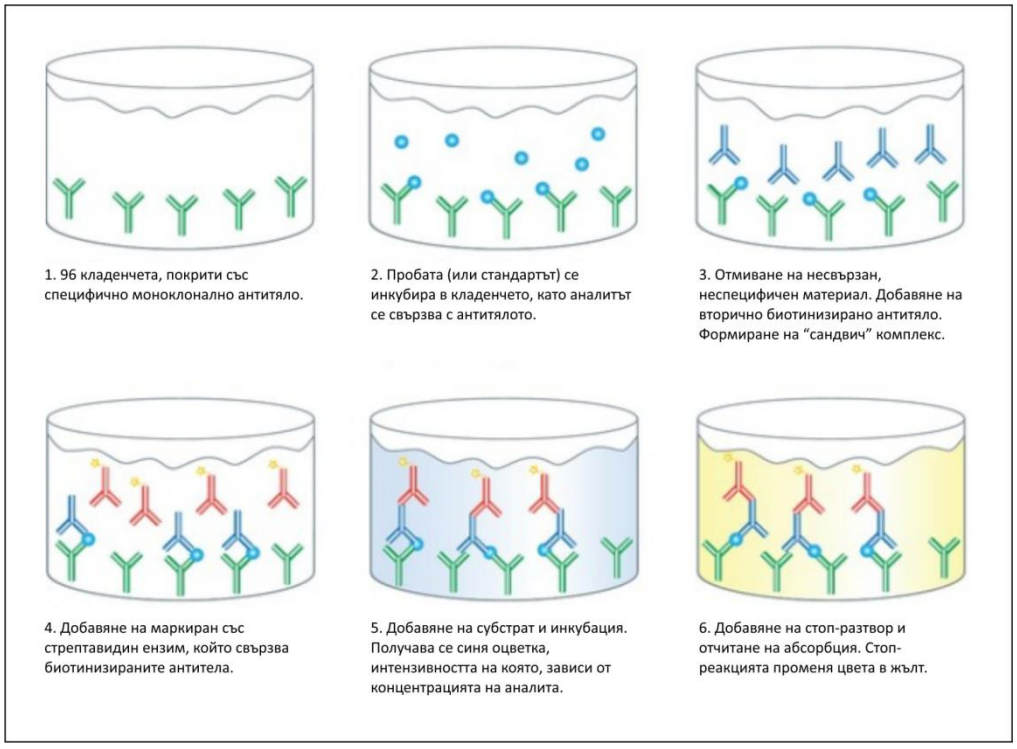
2.1. От пациентите, подложени на планова оперативна интервенция- кардиопулмонален байпас, беше взета урина от уринаторната торбичка в количество 20 – 50 mL на 6-ия час след съдовата анастомоза. Уринатa беше прехвърлена в полипропиленови епруветки и центрофугирана за 20 мин. при 1000g. От надстоящата течност бяха прехвърлени по 1 mL в 4 идентифицирани вторични полипропиленови епруветки тип Eppendorf®. Материалите бяха съхранявани при -20◦С 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◦С 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 7. 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

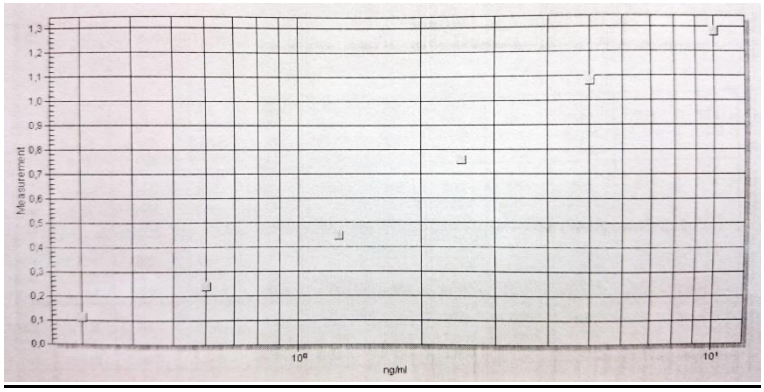
- множествен регресионен анализ за оценка на функционалните зависимости между лабораторните показатели и други демографски и клинични параметри
- криви на Kaplan-Meier за оценка на емпиричната експоненциална зависимост между преживяемостта и следоперативния период при пациенти, развили остро бъбречно 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.

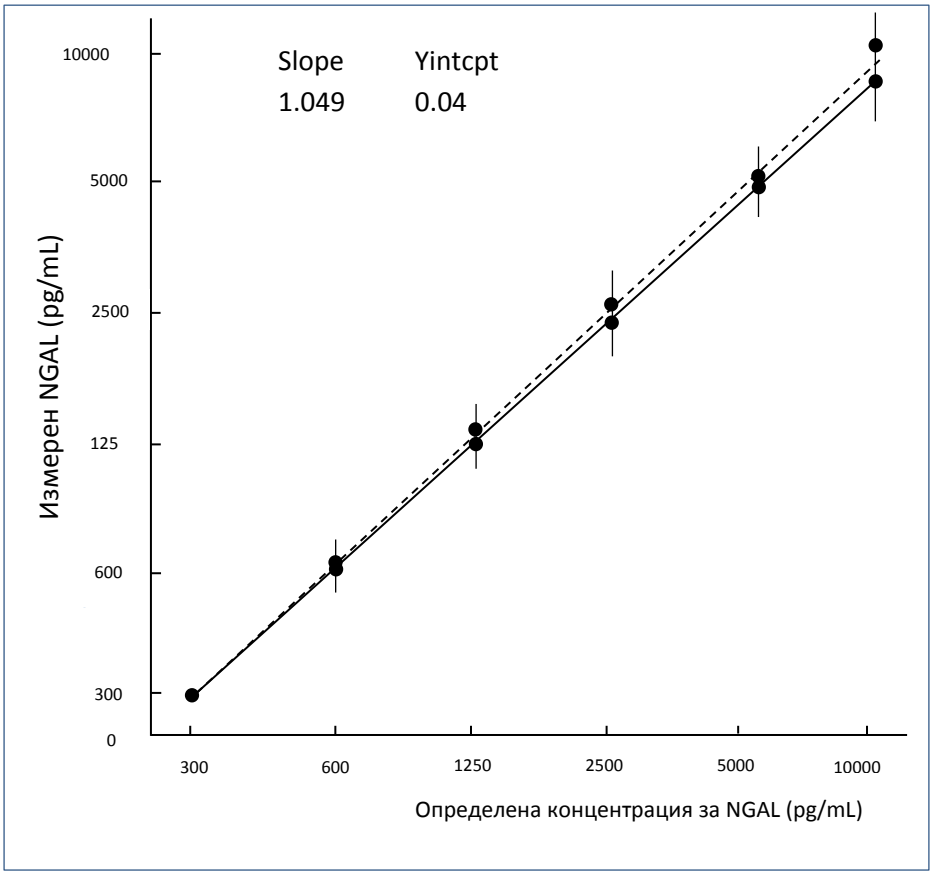
1.1. Аналитичен обхват (линейност): За определяне линейността на метода от стандартен разтвор с висока концентрация и разреждащ разтвор бяха приготвени 6 еквидистантни разредки. Всеки разтвор беше апликиран двойно, построена калибрационна крива и беше изчислено уравнението на линейна регресия. Графиката 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 8. Калибрационна крива от определяне на uNGAL с Human Lipocalin-2/NGAL ELISA метод.



Фигура 9. 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 5. 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 6. 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.

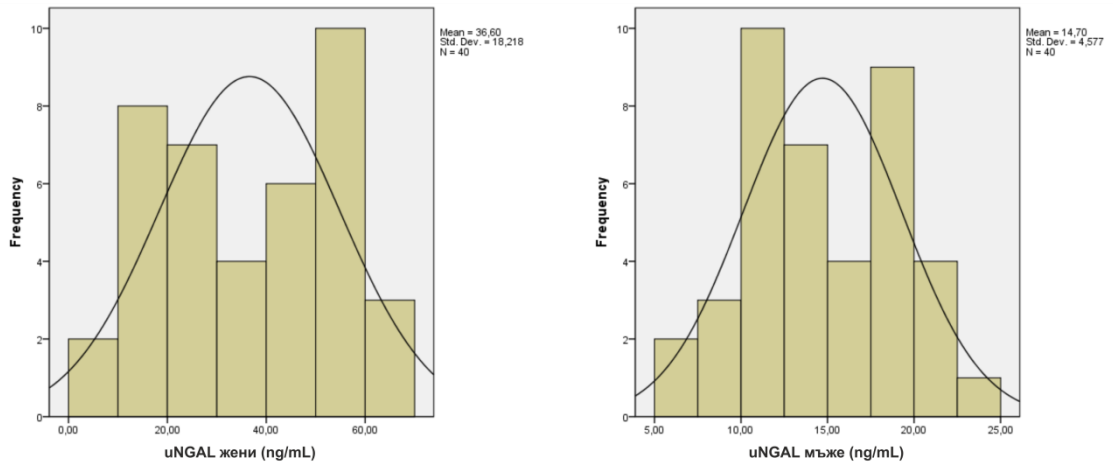
На 80 здрави доброволци (40 мъже и 40 жени) бяха взети кръв и урина и изследвани за серумен и уринен креатинин, както и за

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.

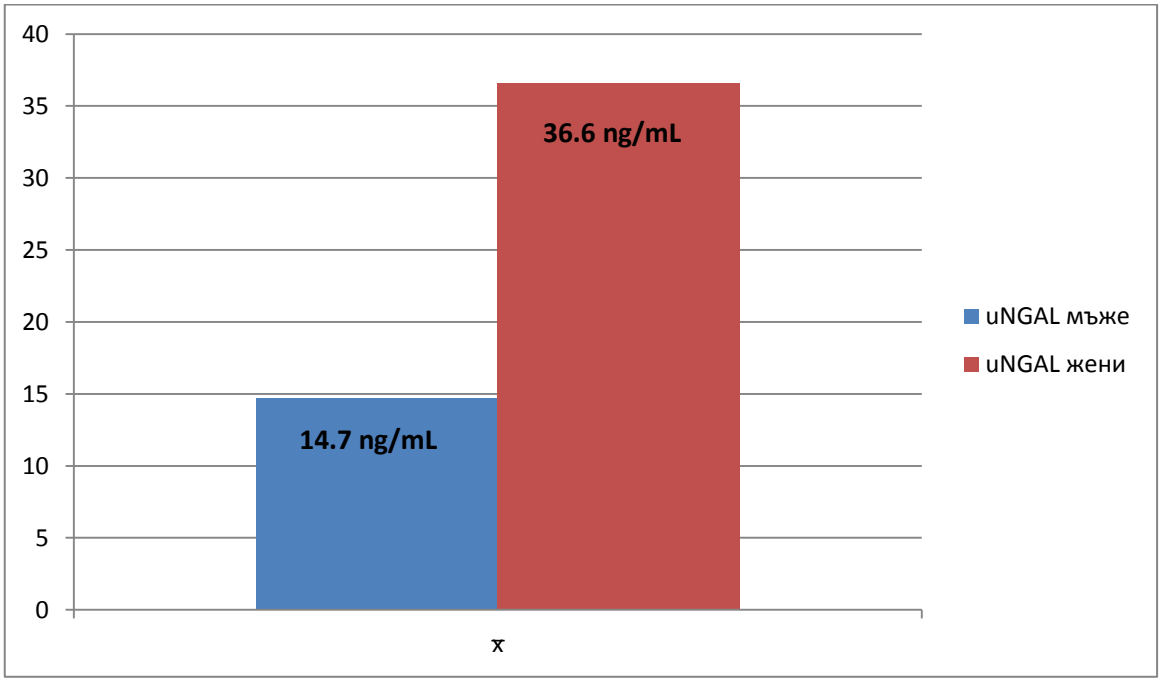
Очертаха се статистически значими разлики между двата пола, поради което доброволците бяха разделени на две групи- мъжки и женски пол. При всяка от групите разпределението на резултатите беше от Гаусов тип и беше приложен параметричен подход за определяне на референтните граници.

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

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



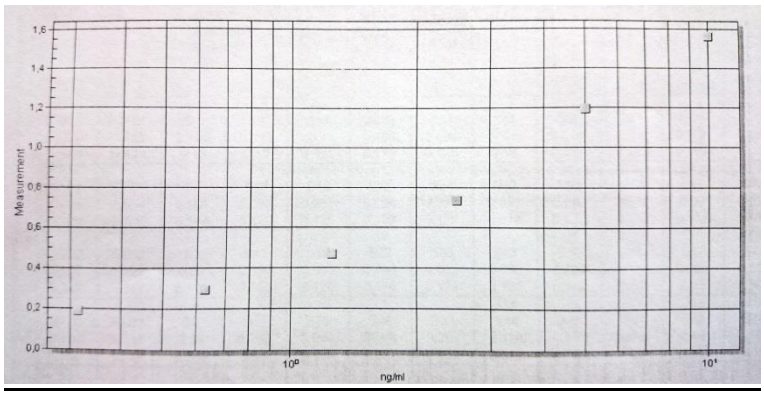
Фигура 10. Разпределение на резултатите за uNGAL при здравите контроли от женски и мъжки пол.



Фигура 11. $\bar{x}$ 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.

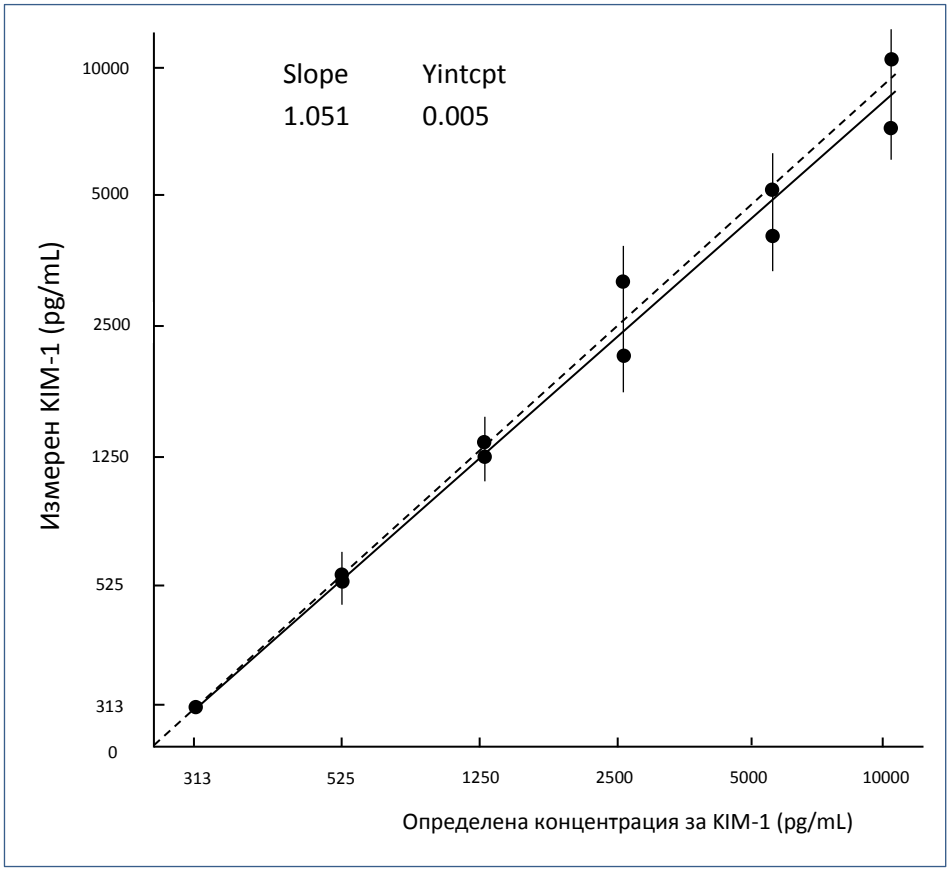
2.1. Аналитичен обхват (линейност): За определяне линейността на метода от стандартен разтвор с висока концентрация и разреждащ разтвор бяха приготвени 6 еквидистантни разредки. Всеки разтвор беше апликиран двойно, построена калибрационна крива и беше изчислено уравнението на линейна регресия. Графиката 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 12. Калибрационна крива от определяне на Human KIM-1 ELISA в урина.



Фигура 13. 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 7. 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 8. uKIM-1 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	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.

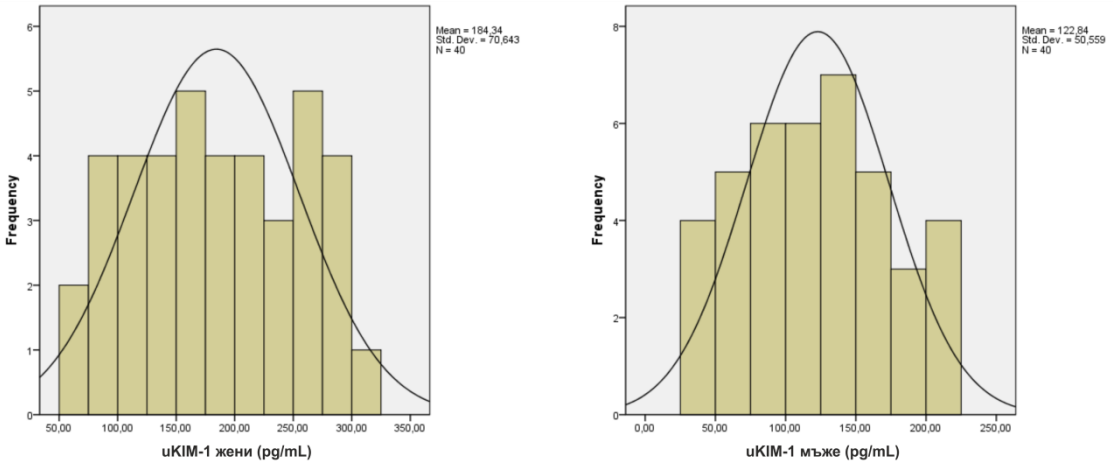
На 80 здрави доброволци (40 мъже и 40 жени) бяха взети кръв и урина и изследвани за серумен и уринен креатинин, както и за KIM-1 в урина. Въз основа на серумния креатинин, възрастта, пола и

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.

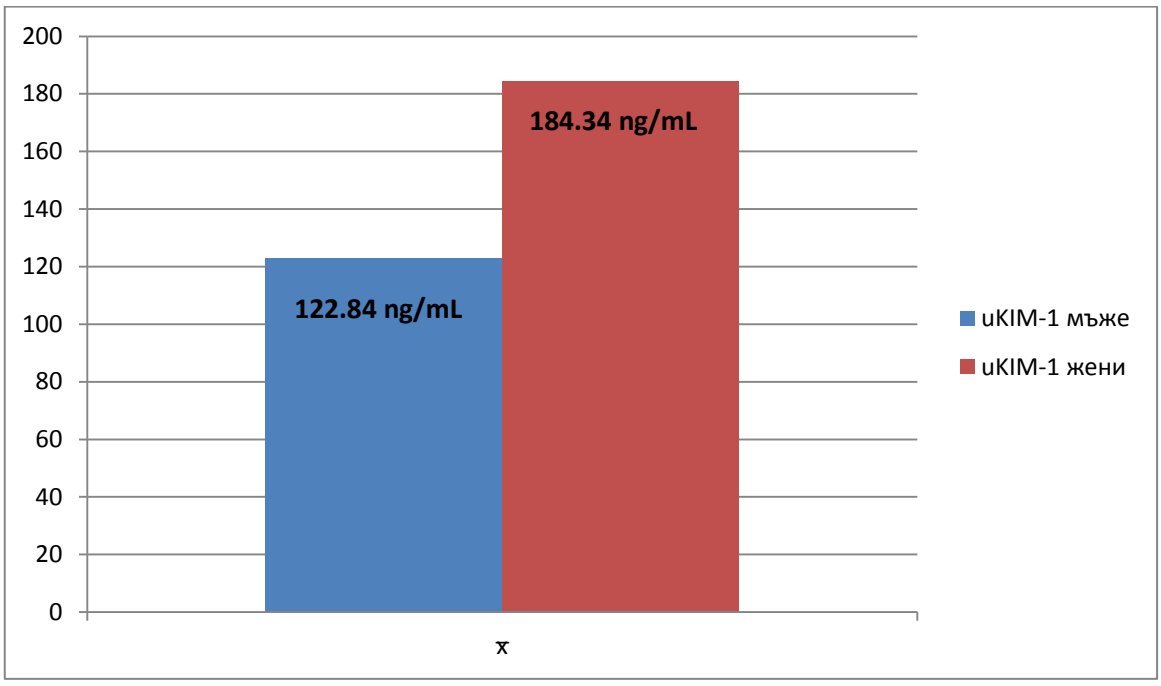
Очертаха се статистически значими разлики между двата пола, поради което доброволците бяха разделени на две групи - мъжки и женски пол. При всяка от групите разпределението на резултатите беше от Гаусов тип и беше приложен параметричен подход за определяне на референтните граници.

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

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



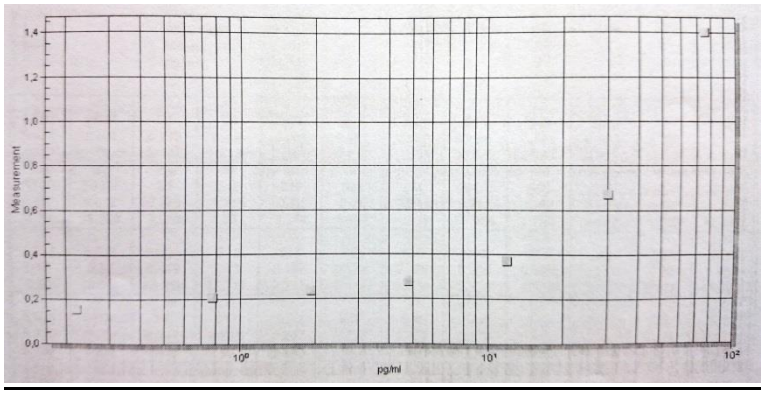
Фигура 14. Разпределение на резултатите за uKIM-1 при здравите контроли от женски и мъжки пол.



Фигура 15. $\bar{x}$ 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.

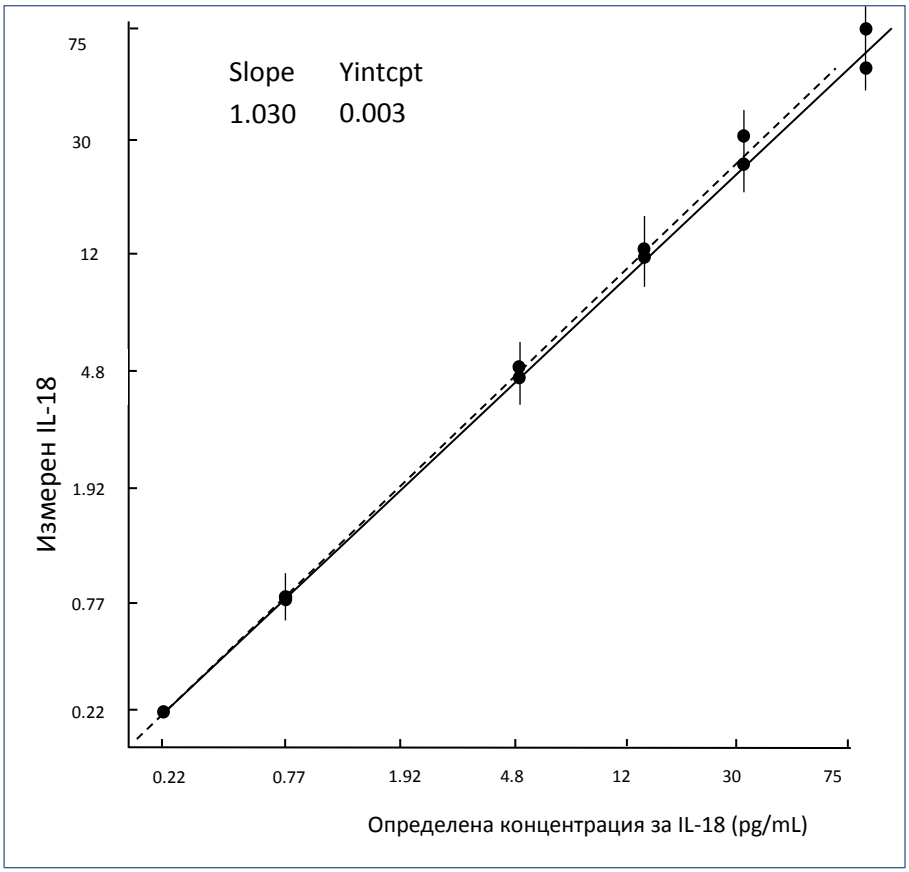
3.1. Аналитичен обхват (линейност): За определяне линейността на метода от калибратор с висока концентрация и разреждащ разтвор бяха приготвени 6 еквидистантни разредки. Всеки разтвор беше апликиран двойно, построена калибрационна крива и беше изчислено уравнението на линейна регресия. Графиката на линейността 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 16. Калибрационна крива от определянето на Human IL-18 ELISA в урина



Фигура 17. 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 9. 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 10. 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

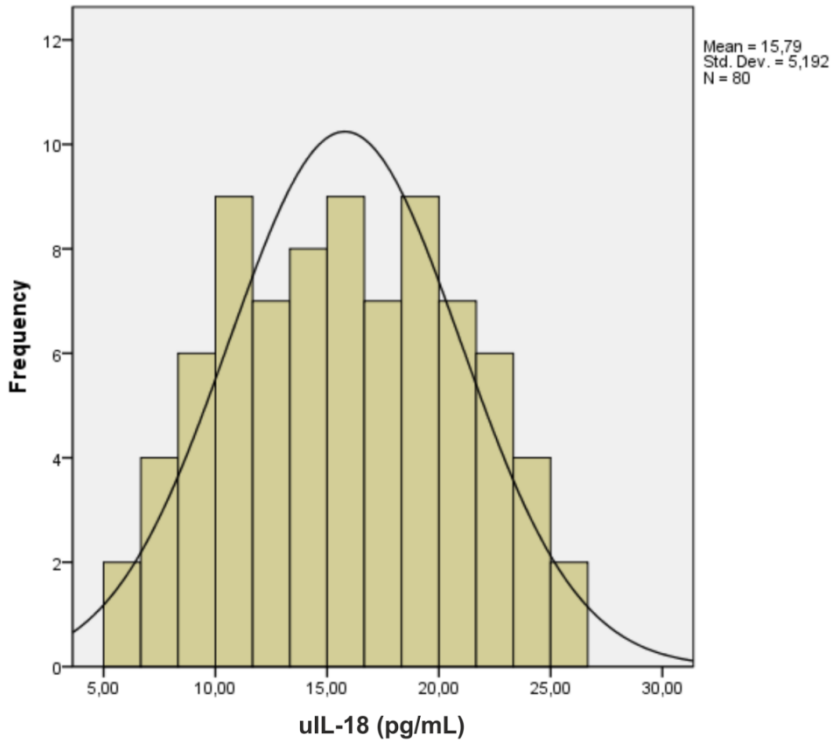
Средна аналитична откриваемост: 93.1%

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

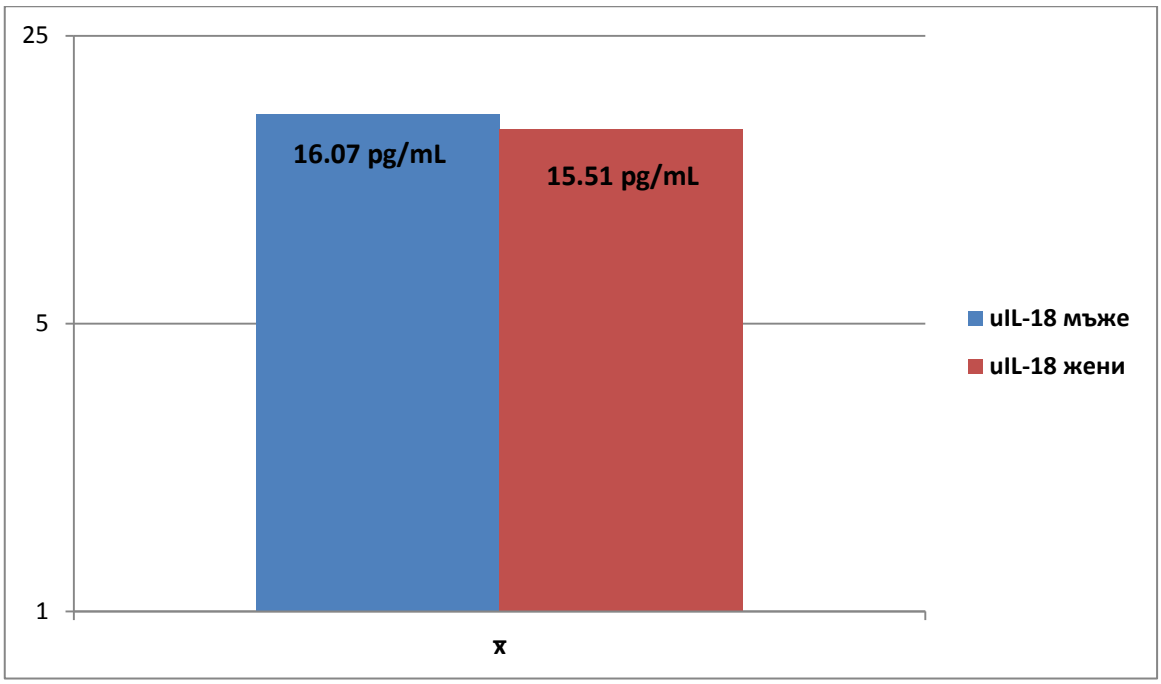
На 80 здрави доброволци (40 мъже и 40 жени) бяха взети кръв и урина и изследвани за серумен и уринен креатинин, както и за IL-18 в урина. Въз основа на серумния креатинин, възрастта, пола и расата на контролните индивиди беше изчислена гломерулната филтрация по MDRD. При всички доброволци GFR беше > 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 ($\bar{x}$) на резултатите на всички здрави доброволци 15.79 pg/mL, стандартно отклонение (SD) 5.19 и нормално разпределение, по формулата $\bar{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал) бяха определени референтни граници за IL-18 в урина за българската популация: 5.41 – 26.17 pg/mL.



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



Фигура 19. $\bar{x}$ 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.

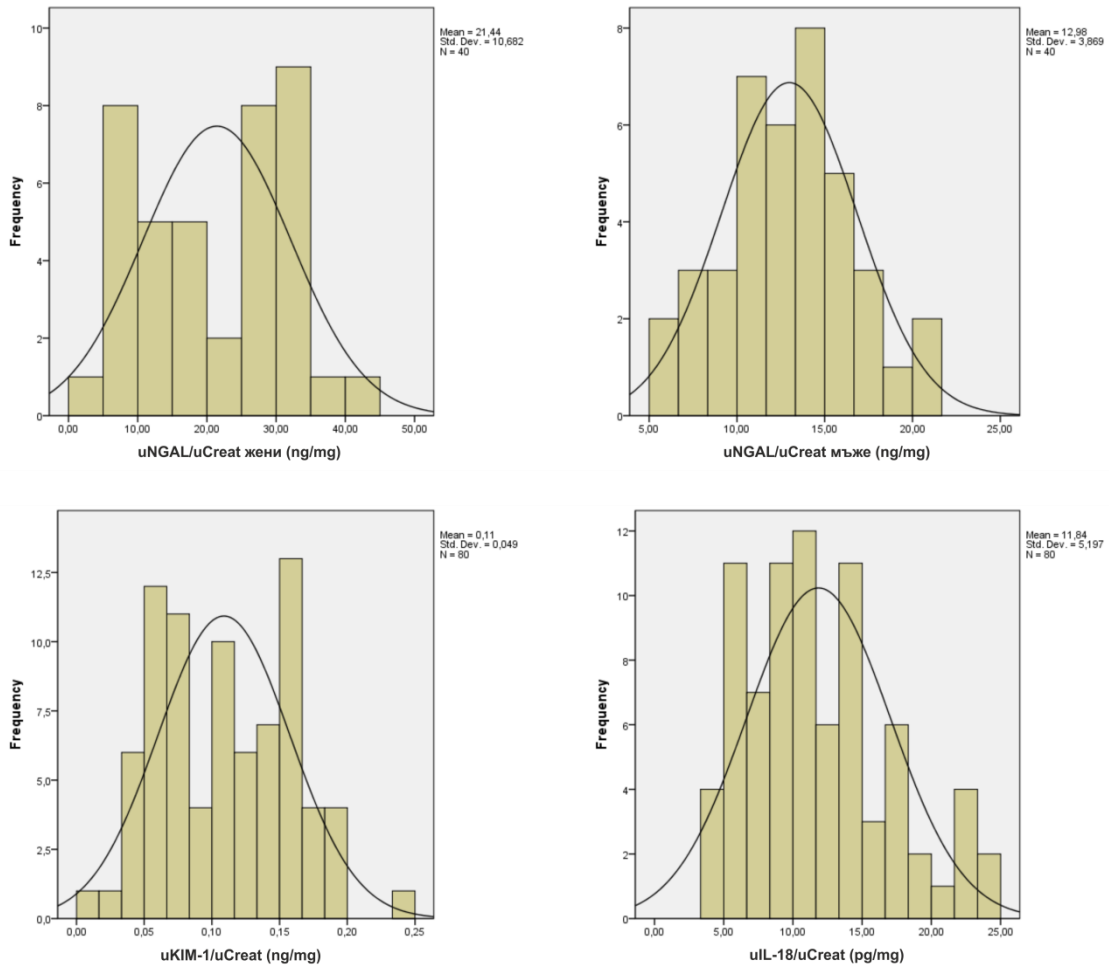
При здравите доброволци от мъжки пол изчислената $\bar{x}$ беше 12.98, SD 3.87 и по формулата $\bar{x} \pm 2SD$ (95% доверителен интервал) бяха определени референтни граници за uNGAL/uCreat при мъже за българската популация 5.24 – 20.72 ng/mg.

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 20. 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 11. 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.

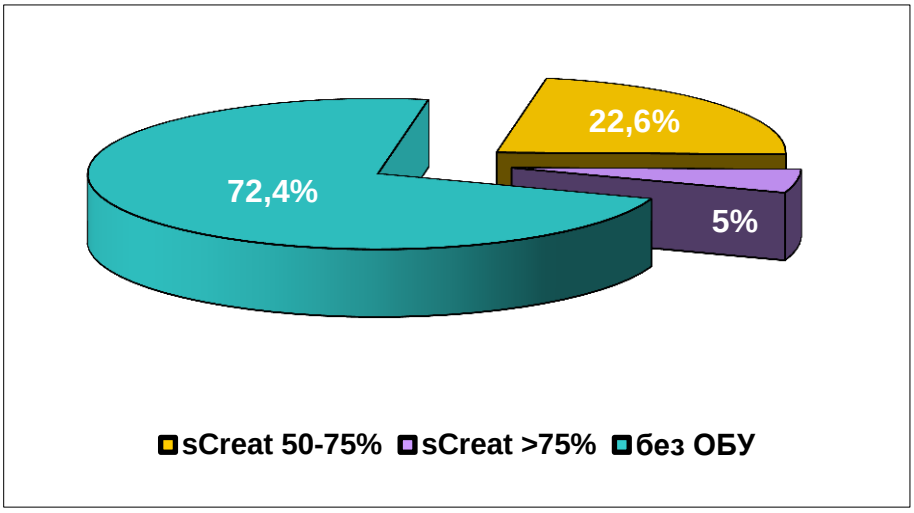
Таблица 12. Демографски и клинични характеристики на пациентската група.

	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

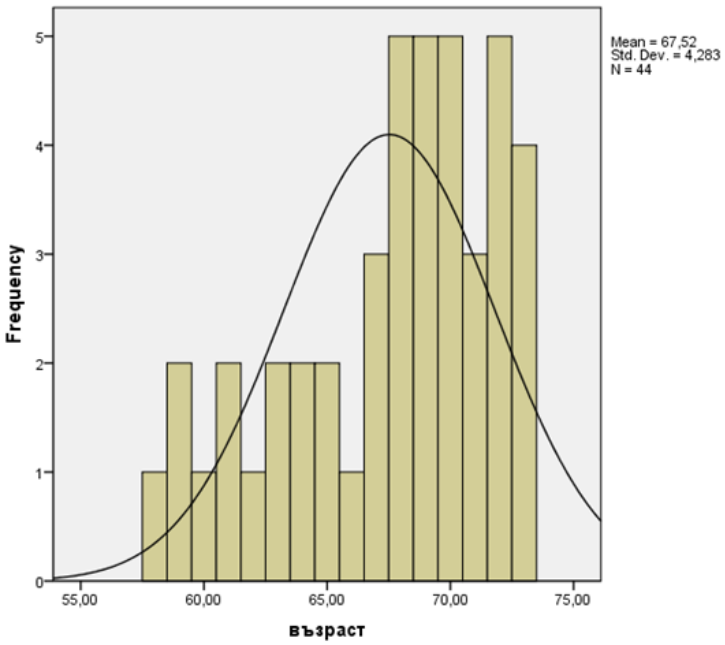
** GFR, изчислена по MDRD формулата в mL/min/1.73m^2*

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.



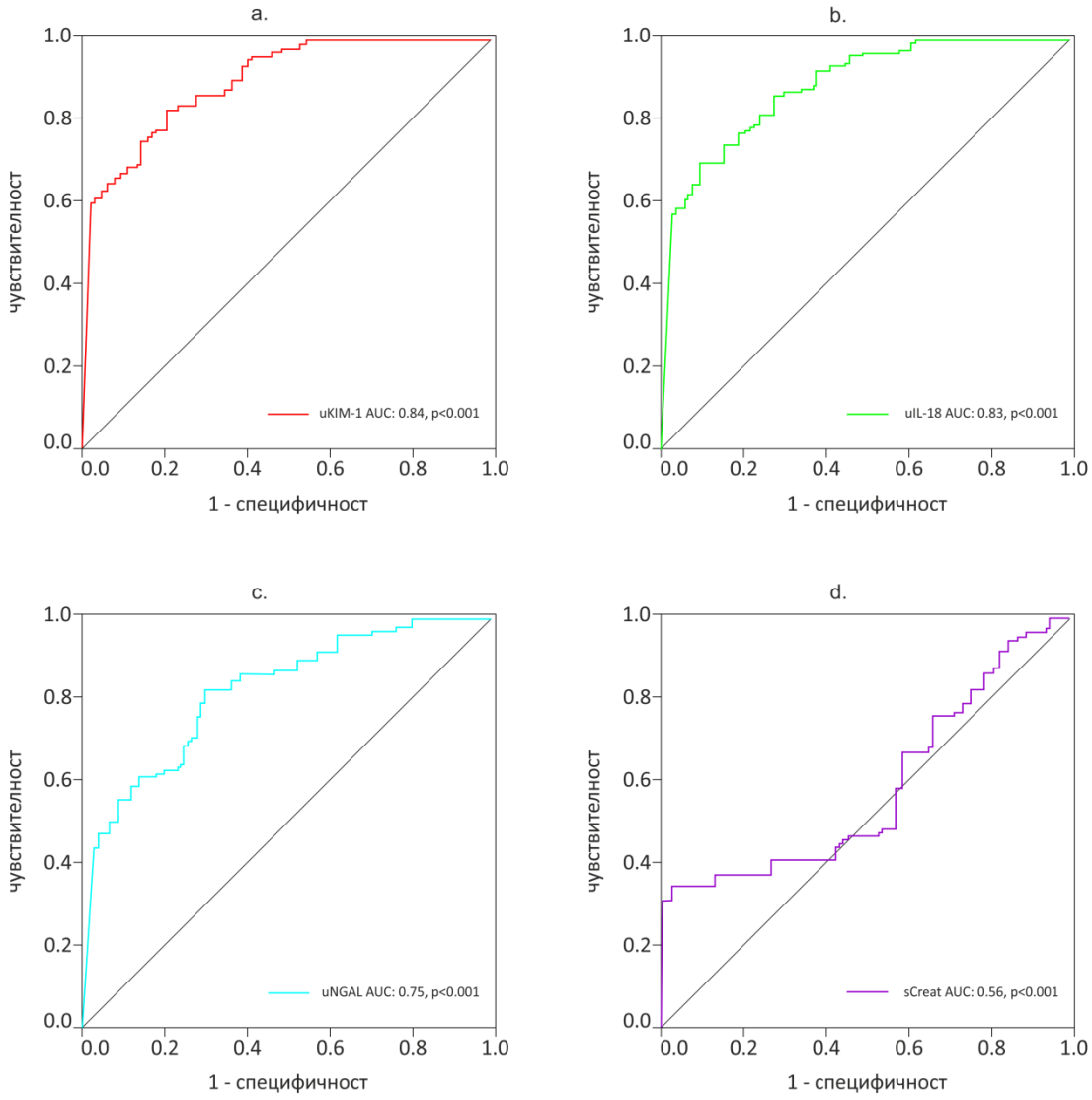
Фигура 21. Разпределение на пациентите (n=160) по наличие или отсъствие на ОБУ и неговата тежест.



Фигура 22. 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

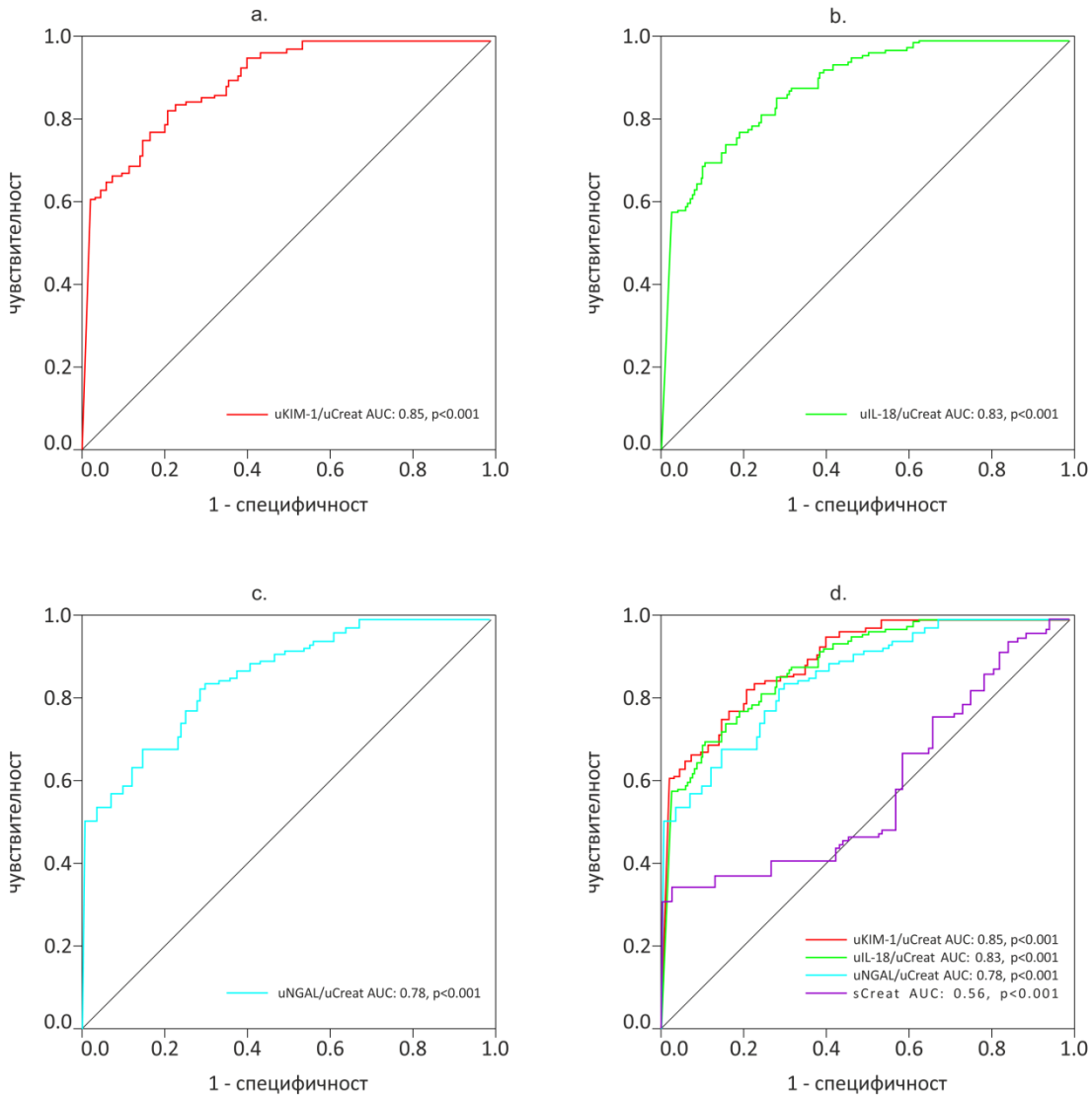
uIL-18 се получиха съпоставими резултати- AUC 0.83 (p<0.001). uNGAL показа най-ниска диагностична чувствителност и специфичност с AUC 0.75 (p<0.001).



Фигура 23. 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 24. ROC (receiver operator characteristic) криви.

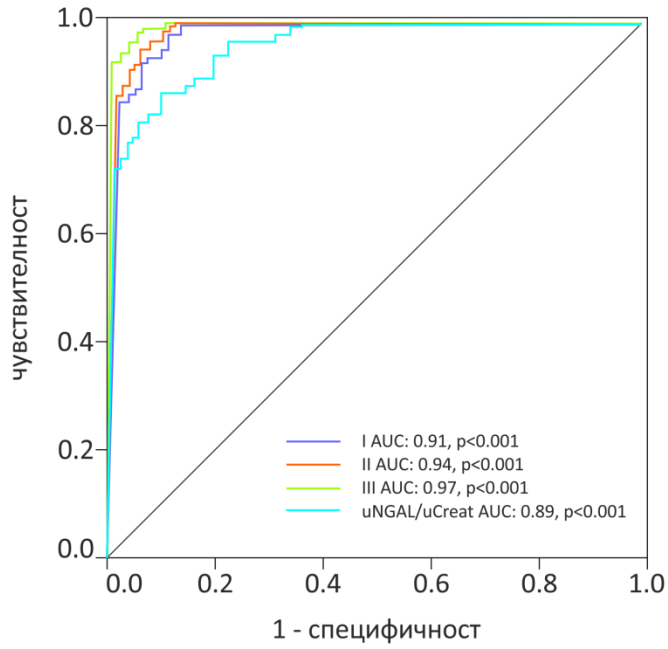
a. диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ; b. диагностична специфичност и чувствителност на uIL-18/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен в първите 2-6 часа след КПБ; c. диагностична специфичност и чувствителност 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 [13]. 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 13. 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 uIL-18/uCreat	да	0.09
II.	uNGAL/uCreat uKIM-1/uCreat	да	0.12
III.	uNGAL/uCreat uKIM-1/uCreat uIL-18/uCreat	да	0.15

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



Фигура 25. Диагностична чувствителност и специфичност на различни комбинации от ранни уринни показатели.

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.

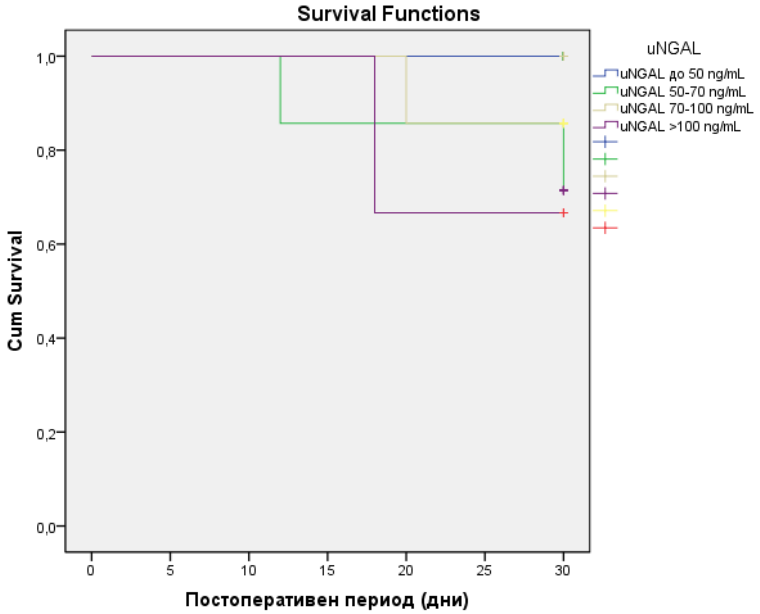
Таблица 14. Корелация между възраст, продължителност на операцията и ранните уринни показатели.

		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

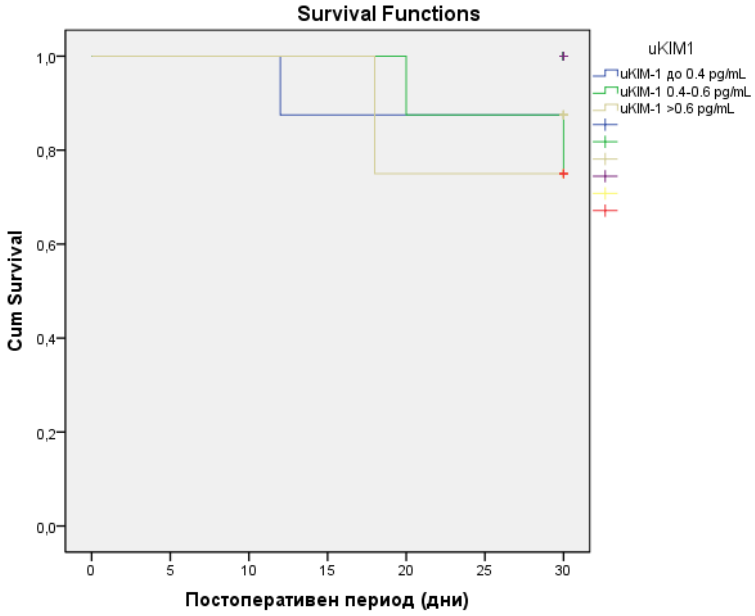
*p<0.05

**p<0.01

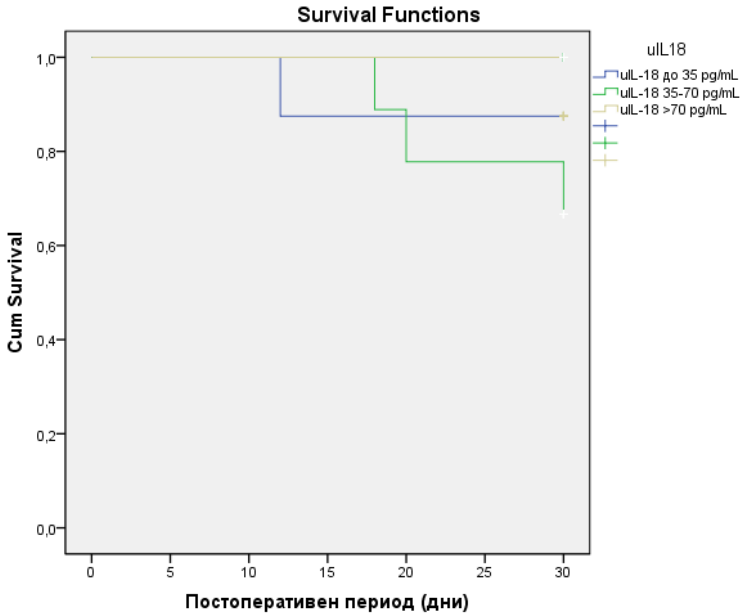
За оценка на 30-дневната преживяемост при пациентите, развили ОБУ, беше построена крива на Kaplan-Meier, като пациентите бяха стратифицирани въз основа на степента на повишение на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18: Фигури 26, 27 и 28.



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.

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 15. Демографски и клинични характеристики на пациентската група.

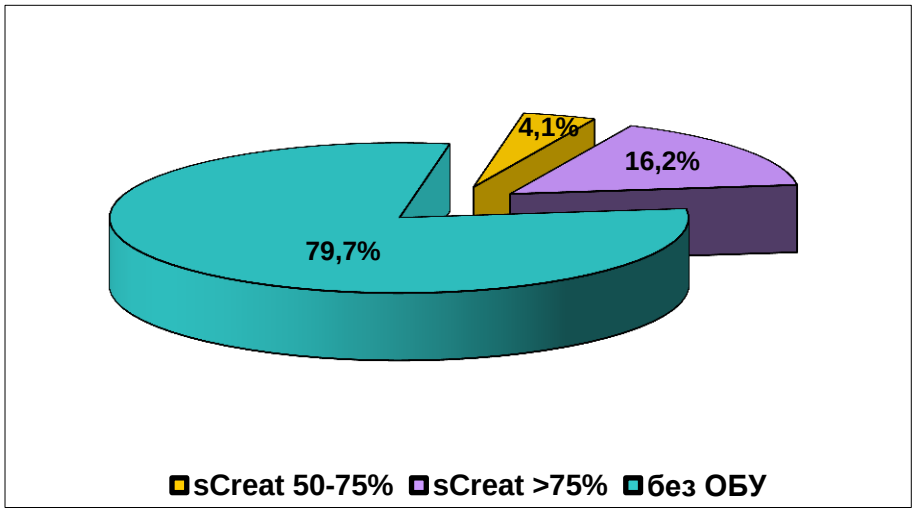
	Общ брой пациенти	**Пациенти с ОБУ**	**Пациенти без без ОБУ**
Общ брой	74	15 (20.3%)	59 (79.7%)
Мъже	49 (66.2%)	9 (12.2%)	40 (87.8%)
Жени	25 (33.8%)	6 (8.1%)	19 (91.9%)
Средна възраст	59.5	58.6	60.4
ОМИ*	5 (6.8%)	1/15 (6.7%)	4/74 (5.4%)
Мозъчен инсулт	3 (4.1%)	1/15 (6.7%)	2/74 (2.7%)
Сепсис	4 (5.4%)	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*

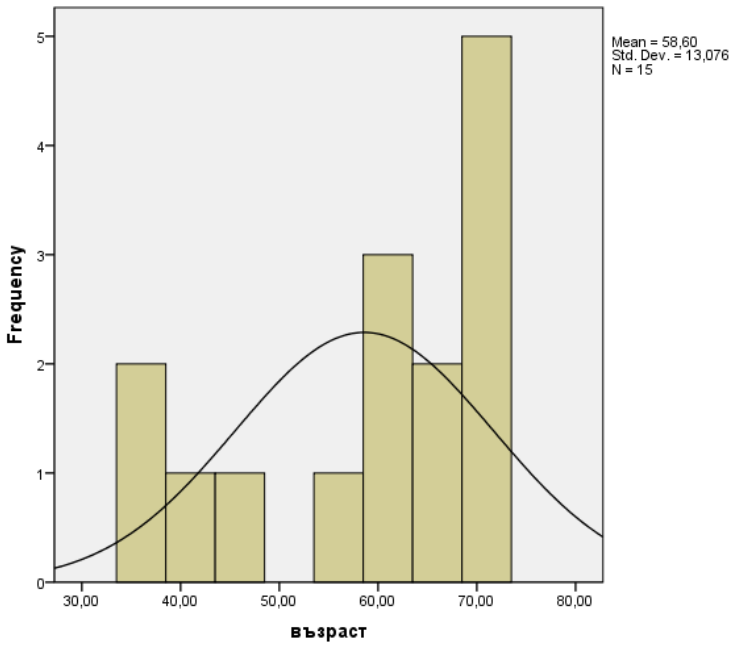
***ХБЗ- хронично бъбречно заболяване*

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.



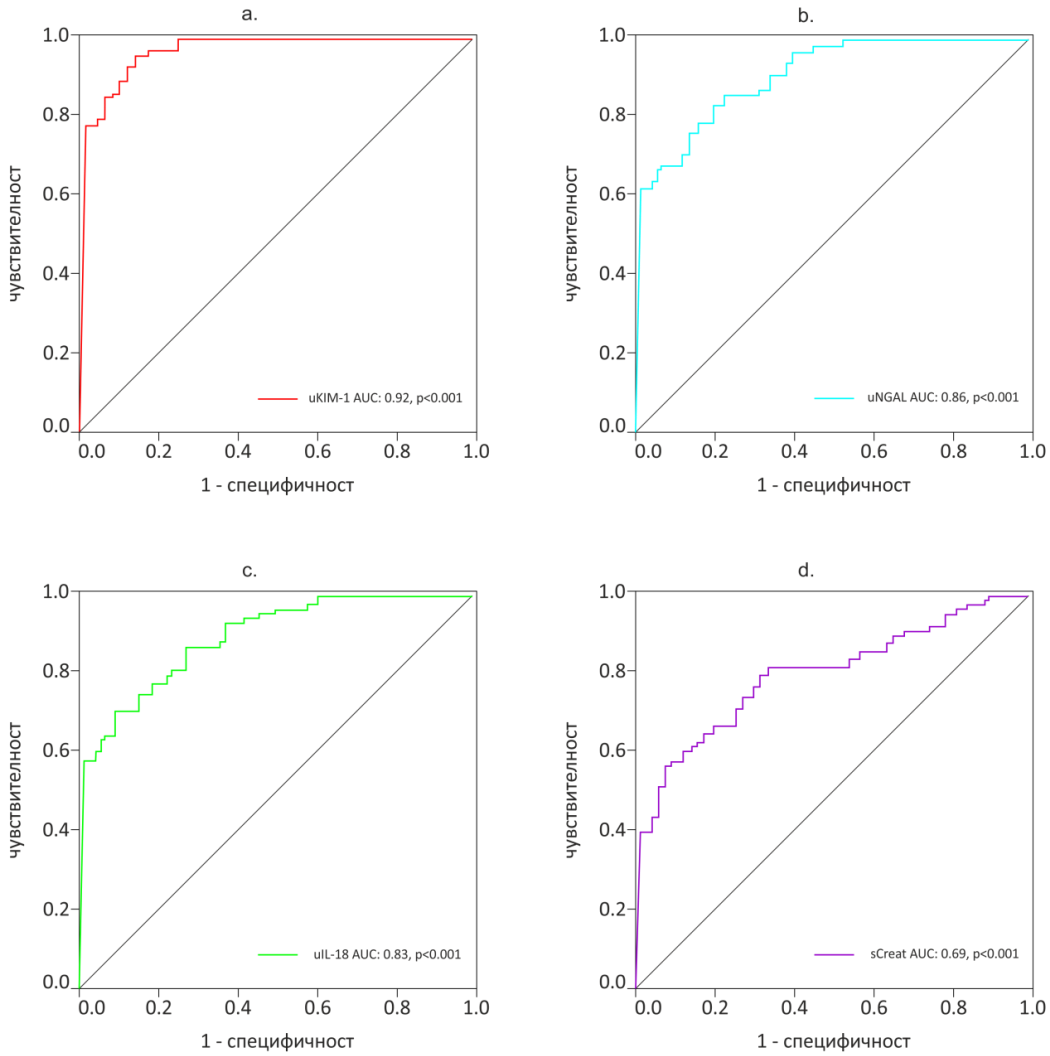
Фигура 29. Разпределение на пациентите (n=74) по наличие или отсъствие на ОБУ и неговата тежест.



Фигура 30. 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.

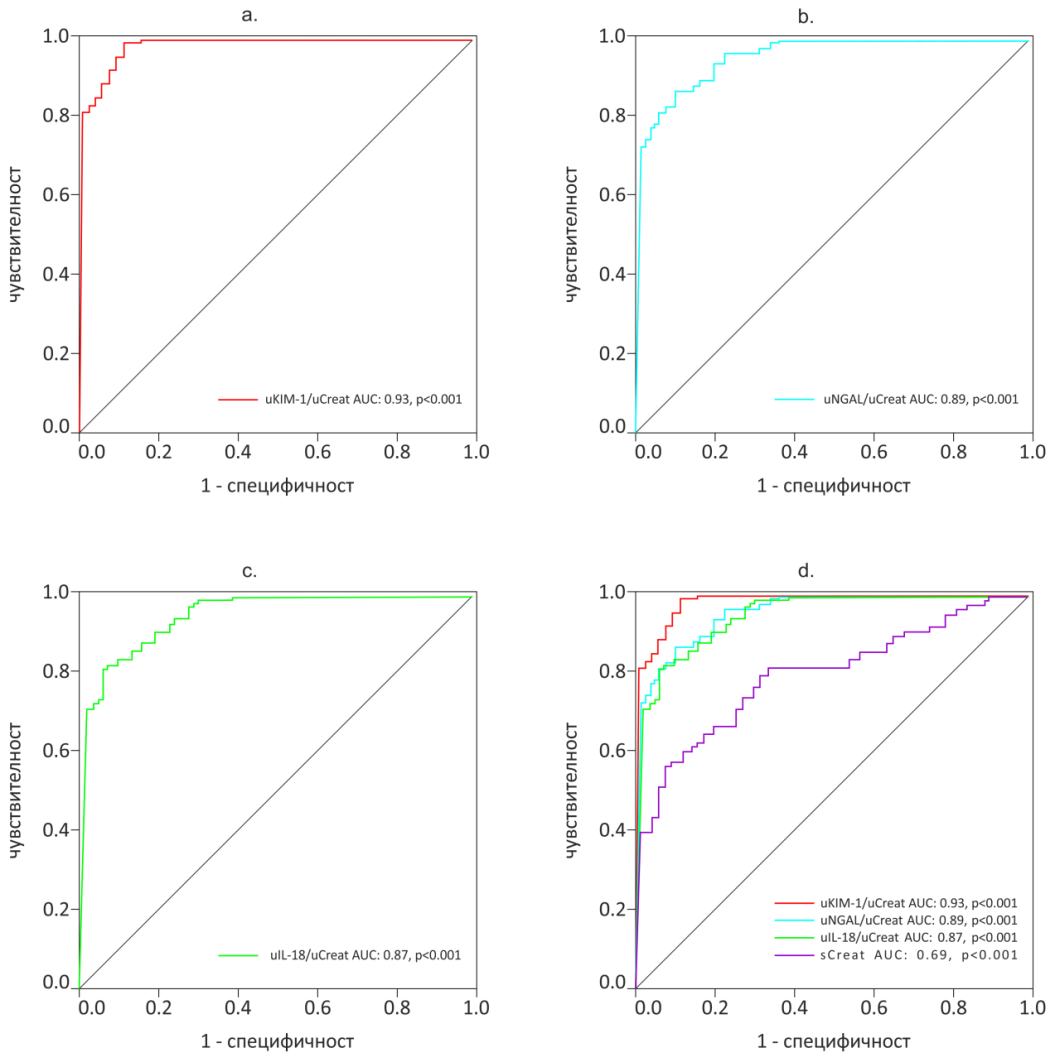
При самостоятелно определяне на структурните уринни показатели на 2-ия час след постъпване в спешно отделение резултатите от ROC-анализа показаха най-висока AUC (област под кривата) за uKIM-1- 0.92 (p<0.001); за uNGAL- AUC 0.86 (p<0.001);за uIL-18- AUC 0.83 (p<0.001).



Фигура 31. 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 32. ROC (receiver operator characteristic) криви.

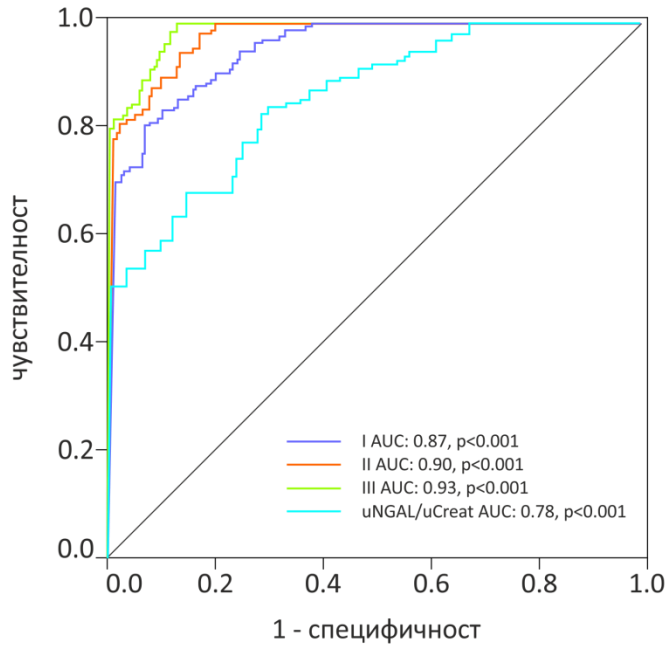
a. диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване в спешно отделение; b. диагностична специфичност и чувствителност на uNGAL/uCreat по отношение развитието на ОБУ, измерен на 2-ия час след постъпване; c. диагностична специфичност 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 16. 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** **ΔAUC***
I.	uNGAL/uCreat uIL-18/uCreat	да	0.02
II.	uNGAL/uCreat uKIM-1/uCreat	да	0.05
III.	uNGAL/uCreat uKIM-1/uCreat uIL-18/uCreat	да	0.08

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



Фигура 33. Диагностична чувствителност и специфичност на различни комбинации от ранни уринни показатели.

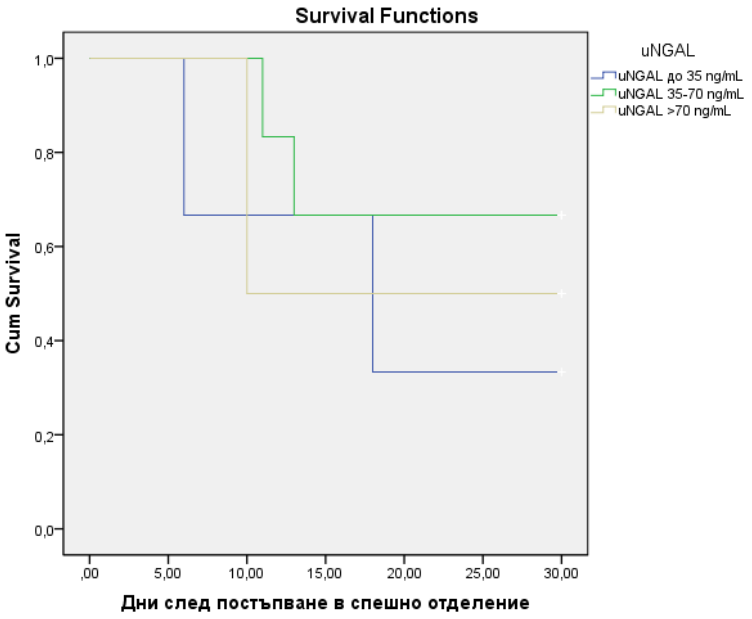
Беше установена умерена степен на корелация между възрастта и измерените нива на uIL-18 на втория час след постъпване в спешно отделение при пациентите, развили ОБУ и висока степен на корелация между степента на бъбречно засягане и измерените нива на uNGAL и uIL-18.

Таблица 17. Корелация между възраст, продължителност на операцията и ранните уринни показатели.

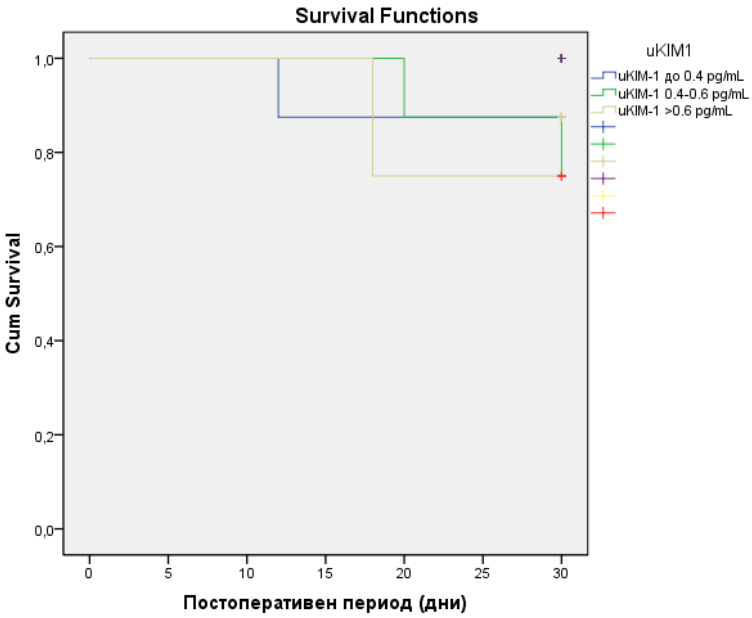
		uKIM-1 (T=2)	uNGAL (T=2)	uIL-18 (T=2)
възраст	Pearson Correlation	,380	,470	,520*
	Sig. (2-tailed)	,162	,077	,047
	N	15	15	15
ОБУ стадий	Pearson Correlation	,339	,769**	,822**
	Sig. (2-tailed)	,217	,001	,000
	N	15	15	15

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

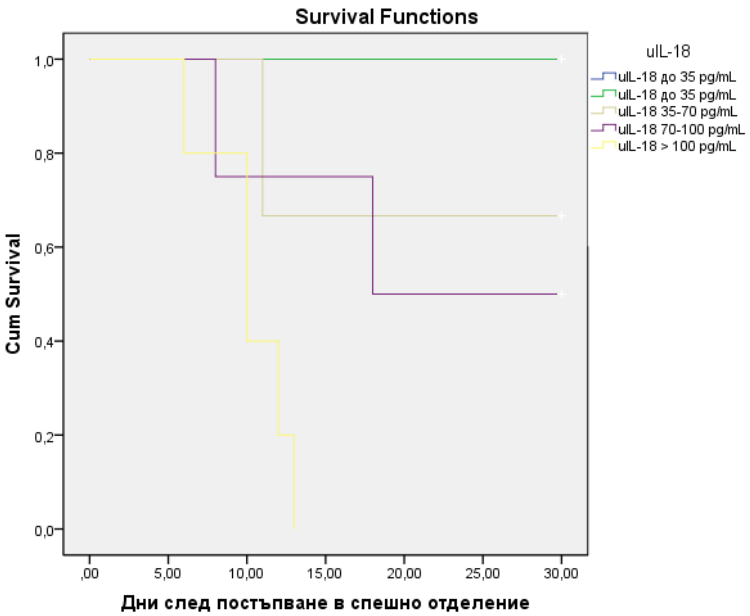
За оценка на 30-дневната преживяемост при пациентите, развили ОБУ, беше построена крива на Kaplan-Meier, като пациентите бяха стратифицирани въз основа на степента на повишение на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18: Фигури 34, 35 и 36.



Фигура 34. Крива на Kaplan-Meier. Преживяемост в зависимост от нивото на uNGAL.



Фигура 35. Крива на Kaplan-Meier. Преживяемост в зависимост от нивото на uKIM-1.



Фигура 36. 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 [114]. 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 [21]. При пациентите с ACRF (остра върху хронична бъбречна недостатъчност) е още по-трудно да се улови моментът на влошаване, тъй като често базовото ниво на sCreat е неизвестно.

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.

uNGAL се явява специфичен показател за дистално тубулно увреждане [131], докато плазменият NGAL може да индикира както увреждане на проксималния тубул, така и друга системна патология. NGAL експресия се открива в черния дроб, белите дробове, панкреаса и яйчниците [154]. Поради тази причина е възможно NGAL в проксималния тубул да отразява реабсорбцията на филтрирания плазмен NGAL с екстраренален произход. Това потвърждава предимството на uNGAL като показател за ренална патология.

Вероятно нивата на плазмения NGAL също биха могли да се повлияят от uNGAL при нарушена или свръхсатурирана ендоцитоза вследствие увреден проксимален тубул [120].

KIM-1 е трансмембранен гликопротеин, който се синтезира в проксималния тубул и се отделя с урината в отговор на исхемично увреждане [60, 70]. Надеждно разграничава исхемия-индуцирано ОБУ от преренална азотемия [125]. При хоспитализирани пациенти с установено ОБУ нивата му в урината имат висока прогностична стойност по отношение на неблагоприятния клиничен изход, каквито са нуждата от бъбречно-заместителна терапия и смърт [93]. В проучване сред критично болни възрастни с ОБУ нивата на KIM-1 са значително повишени в сравнение със здравите контроли [164].

IL-18 е провъзпалителен цитокин, който се повишава при ОБУ. Патогенната му роля при ОБУ е описана при животински модели, при които инхибирането на синтеза или активността му предпазват бъбрека от увреждане [112]. Ранните стойности на IL-18 в урината корелират с тежестта на ОБУ и смъртността. Като цяло IL-18 се оказва по-специфичен за исхемично ОБУ и почти не се повлиява от ХБЗ или инфекция на уринарния тракт. По-добре проучена е прогностичната му стойност в педиатрията, отколкото при възрастни пациенти [96].

Последни проучвания поставят под въпрос диагностичната и прогностична стойност на самостоятелното определяне на единичен ранен показател [121].

Верифициране на ELISA методите

uNGAL

Графиката на линейността показа slope 1.049 и приемлива за клинични цели линейност до 9.55 ng/mL. За проверка на калибрационната крива бяха определени LLOQ и ULOQ, като получените резултати са в съответствие с международните изисквания. При оценката на възпроизводимостта на метода в серия и между серии в две концентрационни области се получи допустима невъзпроизводимост, сравнима със заявената от производителя на диагностичния кит. Данните от определянето на достоверността по метода на стандартната добавка показаха висока аналитична откриваемост.

След обработването на данните от резултатите при здравите контроли се получиха статистически значими разлики за uNGAL между двата пола, с очаквано по-високи стойности при жените. Тъй като резултатите, 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.

Таблица 18. Обобщение на резултатите от верифицирането на ELISA метод за определяне на uNGAL.

Линейност		Невъзпроизводимост				recovery %	Реф. граници	
до 9.55 ng/mL		ниска конц. в серия	висока конц. в серия	ниска конц. между серии	висока конц. между серии	91.2%	жени	мъже
LLOQ	ULOQ						до 73.04 ng/mL	до 23.86 ng/mL
0.32 ng/mL CV19.8% d% 4.46	9.55 ng/mL CV 13.1% d% 6.1	SD 0.8 CV 10.5%	SD 4.2 CV 5.0%	SD 0.8 CV 11.1%	SD 4.0 CV 4.9%			

В мащабно проучване на Mayo Clinic, Rochester, USA, проведено сред 125 здрави контроли и 363 пациенти, постъпващи в спешно отделение, е извършено аналитично валидиране на ELISA тип „сандвич“ [147]. При определяне на референтни граници, получените от нас стойности за uNGAL са сравними с тези на изследователския екип от Mayo Clinic- до 65 ng/mL за жени и до 23.4 ng/mL за мъже.

uKIM-1

Графиката на линейността показа slope 1.051 и приемлива за клинични цели линейност до 9.7 ng/mL. За проверка на калибрационната крива бяха определени LLOQ и ULOQ, като получените резултати са в съответствие с международните изисквания. При оценката на възпроизводимостта на метода в серия и между серии в две концентрационни области се получи допустима невъзпроизводимост, сравнима със заявената от производителя на диагностичния кит. Данните от определянето на достоверността по метода на стандартната добавка показаха висока откриваемост.

След обработването на данните от резултатите при здравите контроли се получиха статистически значими разлики за uNGAL

между двата пола, с очаквано по-високи стойности при жените. Тъй като при неувреден бъбрек няма експресия на KIM-1, това дава основание за по-голямо удобство да се ползват само горните референтни граници.

Таблица 19. Обобщение на резултатите от верифицирането на ELISA метод за определяне на uKIM-1.

Линейност		Невъзпроизводимост				recovery %	Реф. граници	
до 9.7 ng/mL		ниска конц. в серия	висока конц. в серия	ниска конц. между серии	висока конц. между серии	96.2%	жени	мъже
LLOQ	ULOQ						до 325.6 pg/mL	до 224.0 pg/mL
0.01 ng/mL CV19.5% d% 8.3	9.7 ng/mL CV 13.7% d% 1.58	SD 16.4 CV 4.2%	SD 108.0 CV 5.3%	SD 17.9 CV 4.6%	SD 96.0 CV 4.8%			

uIL-18

Графиката на линейността показа slope 1.030 и приемлива за клинични цели линейност до 74.4 pg/mL. За проверка на калибрационната крива бяха определени LLOQ и ULOQ, като получените резултати са в съответствие с международните изисквания. При оценката на възпроизводимостта на метода в серия и между серии в две концентрационни области се получи допустима невъзпроизводимост, сравнима със заявената от производителя на диагностичния кит. Данните от определянето на достоверността по метода на стандартната добавка показаха висока аналитична откриваемост.

След обработването на данните от резултатите при здравите контроли не се откриха статистически значими разлики за uIL-18

между двата пола. Тъй като резултатите, 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.

Таблица 20. Обобщение на резултатите от верифицирането на ELISA метод за определяне на uIL-18.

<table>
<tr><td colspan="2">Линейност</td><td colspan="4">Невъзпроизводимост</td><td>recovery %</td><td>Реф. граници</td></tr>
<tr><td colspan="2">до 74.4 pg/mL</td><td rowspan="2">ниска конц. в серия</td><td rowspan="2">висока конц. в серия</td><td rowspan="2">ниска конц. между серии</td><td rowspan="2">висока конц. между серии</td><td rowspan="3">93.1%</td><td rowspan="3">до 26.17pg/mL</td></tr>
<tr><td>LLOQ</td><td>ULOQ</td></tr>
<tr><td rowspan="2">0.072 pg/mL CV 19.1% d% 5.6</td><td rowspan="2">74.4 pg/mL CV 14.1% d% 5.4</td><td>SD 0.4 CV 5.8%</td><td>SD 2.3 CV 4.8%</td><td>SD 0.4 CV 6.0%</td><td>SD 2.2 CV 4.8%</td></tr>
</table>

Изчислени съотношения спрямо uCreat

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

Показател		**Референтни граници**
uNGAL/uCreat	жени мъже	до 42.80 ng/mg 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.

Пациенти, подложени на планова сърдечна операция, включваща кардиопулмонален байпас

Исхемичното увреждане води по повишаване на uKIM-1, uIL-18 и uNGAL при пациенти, подложени на сърдечна операция, включваща КПБ [115]. Резултатите от настоящото проучване потвърдиха високата предиктивна стойност на ранните структурни показатели, измерени в урина, за развитието на постоперативно ОБУ. Изчислените съотношения на уринните маркери спрямо уринния креатинин позволиха по-добра сравнимост и по-голяма надеждност на резултатите, тъй като бяха компенсирани някои ефективни модификатори на тяхното представяне като възраст [55], пол, обемни вливания в хода на конкретни пациентски ситуации и др.

Проучването е първото, което изследва повишението на uKIM-1/uCreat, uIL-18/uCreat и uNGAL/uCreat самостоятелно и в комбинации с цел получаване на оптимален диагностичен панел за ранна детекция на ОБУ в първите 2-6 часа след КПБ при възрастни пациенти.

Сърдечните операции, включващи КПБ са най-честите обширни хирургични интервенции, извършвани в болниците в целия свят. В патогенезата на постоперативното ОБУ при тези операции участват исхемия-реперфузия обусловено увреждане; екзогенни токсини (лекарствени средства); ендогенни токсини като желязото, освободено при хемолиза; възпалителен и оксидативен стрес; хирургична травма; интраренални възпалителни отговори. Клиничните модели, базирани на възрастта на пациента и продължителността на КПБ, прогнозират ОБУ с приемлива сигурност, но те се оказват по-надеждни при деца поради отсъствието на съпътстващи променливи като възраст, предшестващо бъбречно заболяване, друго хронично заболяване или диабет [108]. Представянето на резултатите като съотношения спрямо уринния креатинин улеснява оценката на бъбречната функция, компенсирайки различни екстраренални променливи в относително хетерогенна пациентска група [69].

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 [55]. 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.

Пациенти, постъпващи в спешно отделение с различни патологични състояния

Проведеното проучване демонстрира ролята на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 за ранна диагноза на ОБУ. Измерването на структурните показатели в първите часове след постъпване на пациент в спешно отделение позволява идентифициране на ОБУ много по-рано, отколкото определянето на серумен креатинин (средно 48 часа след приема). Ранната диагноза и стратификацията на риска от развитие на ОБУ са критични по отношение на адекватната терапия. Основен проблем сред пациентите, постъпващи в спешно отделение е разграничаването на различните видове бъбречно засягане, още повече че в повечето случаи изходната бъбречна функция е неизвестна.

Представените с помощта на AUC-ROC анализ чувствителност и специфичност на uNGAL, uKIM-1 и uIL-18 демонстрират отлична предиктивна стойност на uKIM-1 и много добра предиктивна стойност на uNGAL и uIL-18 по отношение развитието на ОБУ при пациенти, постъпващи в спешно отделение с различна окончателна диагноза.

Всеки един от изследваните структурни показатели, измерен самостоятелно, разкрива изключителна предиктивна стойност за развитието на ОБУ. Подобно на Cystatin C, чиито нива се влияят от възпаление и от тиреоидната функция, така и ранните структурни биомаркери имат своите недостатъци, свързани основно с обемни вливания в хода на конкретни пациентски случаи, както и с влиянието на основното заболяване при хетерогенни пациентски групи. Това дава повод да се търсят оптимални комбинации (панели) от биомаркери, които с най-голяма точност да предвидят риска от развитие на ОБУ.

Развитието на ОБУ е свързано с допълнителни терапевтични мероприятия, удължен болничен престой и увеличена смъртност. Това води до допълнително финансово обременяване на затормозеното здравеопазване в глобален мащаб.

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.

Приложения

Формуляр- протокол от проучването

2014/2015г.

И.З./Дата

Диагноза

_____

/Име, презиме, фамилия/ /възраст/

ЕГН | | | | | | | | | | |

_____

/Адрес/ /телефон/

❑ Хронично бъбречно заболяване	❑ ACE анхибитори
❑ Нефролитиаза	❑ Нестероидни противовъзпалителни средства
❑ Захарен диабет	❑ Аминогликозиди
❑ Автоимунни заболявания	❑ Amphotericin B
❑ Системна инфекция	❑ Цитостатици
	❑ Радиоконтрастни вещества

Изследвания	Стойност	Коментар
Серумен креатинин предоперативно		
NGAL (2-6 час постопетативно)		
KIM 1 (2-6 час постопетативно)		
IL-18 (2-6 час постопетативно)		
Серумен креатинин 48 часа постоперативно		

Усложнения

_____

Допълнителни изследвания

_____

Коментар

_____

_____

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПАЦИЕНТА

Относно: клинично проучване

Определяне на NGAL, IL-18 и KIM-1 в урина за ранна оценка на риска от развитие на остро бъбречно увреждане при различни пациентски групи

Настоящото клинично проучване има за цел оценка на нови лабораторни показатели за ранно диагностициране на остро бъбречно увреждане.

Независимо от непрекъснатото въвеждане на нови диагностични и терапевтични методи в съвременната медицинска практика, случаите на остро бъбречно увреждане (ОБУ) се увеличават в глобален мащаб. В голяма част от случаите ОБУ започва асимптоматично, а към настоящия момент диагнозата се основава на късни и не достатъчно надеждни показатели.

ОБУ е често срещано усложнение при пациенти след кардиопулмонален байпас (около 30% от случаите). С въвеждането на нови ранни показатели за ОБУ ще стане възможно регистрирането дори на минимално бъбречно засягане в момент, в който успешно може да се приложат адекватни терапевтични мерки, като по този начин ще се предотврати прогресирането на увреждането и ще се постигне пълно възстановяване.

Най-често задавани въпроси:

1. Защо съм поканен/а да участвам в проучването?

Вие сте поканен/а да участвате в настоящото проучване, тъй като Ви предстои планова хирургична интервенция-кардиопулмонален байпас. Вашият личен принос ще подпомогне научните изследвания, касаещи едно от най-сериозните усложнения след кардиопулмонален байпас.

2. Гарантирана ли е конфиденциалността по отношение на личните ми данни?

За целите на проучването Вашите данни ще бъдат кодирани с идентификационен номер. Вашите име, ЕГН, адрес и други лични ще бъдат известни на водещия изследовател, който гарантира пълна конфиденциалност.

3. Какви манипулации ще ми бъдат извършвани в хода на проучването и крият ли риск за здравето ми?

За целите на проучването ще Ви бъде взета венозна кръв за изследване със затворена система. Иглите и епруветките са за еднократно ползване. Манипулацията се извършва от високо квалифициран медицински персонал - медицинска сестра или медицински лаборант, като не съществува риск за Вашето здраве.

В хода на проучването ще е необходимо и вземането на малко количество урина от уринаторната торбичка, което е напълно атравматично и не крие никакъв риск за Вашето здраве.

4. Мога ли да се оттегля от проучването?

Можете да прекратите Вашето участие в проучването по всяко време, без това да Ви донесе каквито и да било негативи.

5. Трябва ли да спра приема на лекарства по време на проучването?

Вашата лекарствена терапия ще бъде прецизирана само и единствено от лекуващия Ви лекар. За целите на проучването е

необходимо единствено да съобщите на изследователите какви медикаменти приемате.

6. Ще повлияе ли участието ми в проучването на грижите, които получавам от страна на лекуващия ми екип?

Участието Ви в проучването ще Ви даде възможност за по-чести контакти с лекуващия Ви екип, както и с членовете на изследователския колектив. Ще имате повече възможности да обсъждате Вашето състояние, както и Вашето лечение.

7. Ще бъда ли информиран/а за резултатите от проучването?

За обобщаването на резултатите от настоящото проучване ще бъде необходим период от около 1 година, след което те ще бъдат публично оповестени в периодични медицински издания, както и на научни конференции.

Можете да получите информация относно резултатите от проучването по всяко време от членовете на изследователския колектив.

8. Към кого да се обърна, с случай че имам въпроси или почувствам дискомфорт в хода на проучването?

Във всеки един момент можете да се обърнете към лекуващия Ви екип или към членовете на изследователския колектив.

9. Предвижда ли се финансова компенсация за участието ми в проучването?

Поради фундаментални етични причини участието Ви в клиничното проучване няма да бъде компенсирано/заплатено.

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ

ТЕМА: Определяне на NGAL, IL-18 и KIM-1 в урина за ранна оценка на риска от развитие на остро бъбречно увреждане при различни патологични състояния

ИЗСЛЕДОВАТЕЛ: Д-р Жулиета Христова

УВОД

Поканени сте за участие в настоящото изпитване, тъй като Ви предстои планова операция: кардиопулмонален байпас.

Острото бъбречно увреждане е възможно усложнение, което може да настъпи в ранния следоперативен период. Състоянието се характеризира с рязко нарушение на очистващата бъбречна функция, което води до натрупване на токсични вещества в организма.

Към настоящия момент острото бъбречно увреждане се диагностицира основно на база повишените нива на серумен креатинин. За съжаление този показател започва да се повишава 2-3 дни след структурната увреда. Този период може да бъде решаващ за клиничния изход. При навременна адекватна терапевтична намеса могат да бъдат избегнати удължеият болничен престой и всички други неблагоприятни последствия от острото бъбречно увреждане. Тези обстоятелства налагат търсенето на нови по-ранни показатели за настъпило остро бъбречно увреждане.

Вашето участие в настоящото изпитване е доброволно. За да се включите в изпитването, Вие като пациент, трябва да подпишете и датирате настоящия формуляр за съгласие.

ЦЕЛ НА НАСТОЯЩОТО ИЗПИТВАНЕ

Настоящото изпитване цели да се докаже корелацията между нивата на нови уринни показатели (NGAL, KIM-1 и IL-18) в първите часове след планова операция - кардиопулмонален байпас с отсъствието или развитието впоследствие на остро бъбречно увреждане.

Предоперативно ще Ви бъде взета венозна кръв в количество 5 мл за определяне на серумен креатинин. 2-6 часа след оперативната интервенция ще бъде взета урина от уринаторната торбичка за определяне на нивата на новите показатели, фокус на настоящото проучване. 48 часа след оперативната интервенция ще Ви бъде взета повторно венозна кръв в количество 5 мл за определяне на серумен креатинин.

Пробите могат да бъдат съхранявани в лабораторията и използвани за бъдещи изследвания, свързани с изпитването. Вашите проби няма да бъдат използвани за генетични изследвания или за бъдещи изследвания, които не са свързани с настоящото изпитване. Вашите проби ще бъдат унищожени в срок до 1 година от датата на вземане на пробата.

ДЕКЛАРАЦИЯ НА ДОБРОВОЛЕЦА

Декларирам, че имах възможност да задам въпроси и получих задоволителни отговори за тях.

Разбирам, че ако имам допълнителни въпроси мога да се свържа с д-р Жулиета Христова (тел.: 02 9230918).

Давайки съгласието си, декларирам, че участието ми в настоящия изследователски проект е доброволно и мога да се откажа по всяко време или да се оттегля от участие без санкции или загуба на ползи. Подписът ми по-долу означава, че съм прочел/а настоящия формуляр за съгласие, разбирам неговото съдържание и съм получил/а отговор на въпросите си във връзка с настоящия изследователски проект от лекар.

С подписа си по-долу приемам, че бих желал/а да участвам в изпитването.

....

/Име на пациента/ /подпис/ /дата/

Данни от верифицирането на методите

Таблица 22. Данни от проведените изследвания при здравите контроли (n=80)

#	S_{Creat} µmol/L	Възраст	Пол	eGFR mL/min/1.73m^2	U_{Creat} mmol/L	uNGAL ng/mL	uKIM-1 pg/mL	uIL-18 pg/mL
1	63.0	20	ж	111	14.2	53.5	99.8	17.6
2	71.1	23	ж	94	16.5	55.0	116.8	19.4
3	68.1	23	ж	99	17.0	61.3	230.1	16.3
4	59.3	30	ж	110	16.8	9.3	98.5	6.8
5	67.9	36	ж	92	13.8	39.2	185.3	18.1
6	65.4	37	ж	95	14.1	45.2	128.0	13.7
7	56.9	37	ж	112	17.1	10.2	155.0	10.5
8	64.2	37	ж	96	15.6	62.4	294.3	9.8
9	68.0	37	ж	90	16.9	16.8	157.3	21.3
10	69.4	24	ж	96	15.6	25.3	268.1	7.6
11	58.8	40	ж	106	15.4	41.3	75.4	12.0
12	63.2	40	ж	96	13.6	30.1	205.6	7.6
13	56.9	42	ж	109	16.8	29.1	123.9	14.1
14	65.2	40	ж	93	15.4	48.3	188.2	25.3
15	66.8	39	ж	92	13.9	14.6	170.9	11.5
16	61.7	45	ж	98	16.6	47.5	131.2	18.6
17	59.4	45	ж	102	13.9	52.2	180.3	24.3
18	64.3	47	ж	92	14.1	21.6	63.1	16.3
19	71.2	20	ж	97	16.2	36.8	144.4	9.5
20	73.0	25	ж	90	15.5	59.8	268.1	21.1
21	66.7	38	ж	92	15.8	49.6	236.1	12.9
22	60.5	41	ж	102	14.5	28.7	317.4	8.9
23	62.8	42	ж	97	13.4	51.3	68.2	21.3
24	59.9	46	ж	101	17.0	36.1	250.6	18.1
25	68.3	28	ж	94	16.4	15.9	240.8	11.9
26	66.4	30	ж	96	15.9	26.3	270.3	14.3
27	58.1	31	ж	112	14.6	54.9	288.6	10.9
28	59.0	25	ж	114	16.0	52.3	195.2	18.0
29	60.2	22	ж	115	15.8	58.1	144.1	10.2
30	65.8	29	ж	98	14.9	10.2	255.5	15.8
31	64.1	30	ж	100	12.3	8.6	210.6	16.0
32	62.5	34	ж	101	14.3	55.3	98.8	21.3
33	63.1	35	ж	99	12.8	11.5	276.3	19.5
34	61.8	41	ж	98	13.5	65.3	155.6	22.0
35	62.5	40	ж	97	13.9	24.6	222.9	17.6
36	65.8	33	ж	95	12.6	15.8	280.6	15.2
37	60.3	25	ж	112	16.6	48.6	112.6	19.1
38	63.8	24	ж	105	15.3	55.6	161.0	8.9
39	62.9	24	ж	107	16.9	22.8	102.4	11.2
40	65.2	38	ж	94	12.3	13.1	201.8	21.8
41	79.1	36	м	102	8.6	10.6	131.0	14.3
42	88.5	22	м	100	7.9	12.6	120.9	11.3
43	80.3	21	м	112	9.6	7.9	168.4	19.8
44	85.6	23	м	103	9.4	10.9	211.3	15.6
45	86.9	22	м	103	10.1	11.4	75.4	18.3
46	80.5	22	м	111	10.6	9.9	95.6	14.9

47	84.6	23	м	104	8.9	12.9	163.4	11.3
48	89.1	29	м	93	11.5	20.1	69.9	22.1
49	85.7	21	м	105	8.2	19.6	90.4	8.6
50	86.6	34	м	94	12.1	17.8	146.0	24.2
51	75.3	21	м	121	8.5	10.3	166.8	23.1
52	88.2	27	м	96	11.9	22.3	25.3	13.6
53	78.2	41	м	101	9.7	13.8	98.9	24.0
54	80.1	22	м	111	8.0	11.2	63.3	15.2
55	83.5	22	м	107	9.1	10.3	156.4	22.1
56	91.0	23	м	95	11.8	11.2	203.0	12.6
57	82.3	40	м	96	12.7	13.9	188.1	20.6
58	79.4	39	м	101	11.6	17.8	175.5	13.7
59	90.5	21	м	98	10.2	18.3	160.7	15.7
60	77.5	21	м	118	8.0	9.2	218.2	22.4
61	79.3	22	м	113	7.6	12.0	144.1	19.3
62	85.2	23	м	103	10.1	13.3	62.9	25.9
63	87.6	27	м	97	12.5	20.9	49.5	10.5
64	85.9	34	м	95	10.9	21.7	190.2	18.2
65	77.9	34	м	107	7.9	19.0	141.2	20.3
66	71.5	28	м	121	8.5	16.9	48.7	6.4
67	80.6	37	м	99	9.1	13.2	113.2	18.6
68	74.3	24	м	119	10.6	19.0	69.3	9.1
69	78.1	41	м	101	8.9	18.1	101.4	12.9
70	79.0	33	м	104	8.8	14.2	96.1	18.7
71	82.1	30	м	102	9.3	16.9	115.3	14.7
72	80.4	28	м	106	10.3	16.6	131.6	21.6
73	85.5	28	м	98	11.8	24.8	202.3	24.3
74	77.6	22	м	115	12.9	11.1	66.0	6.1
75	74.1	39	м	108	10.6	6.3	98.6	7.0
76	78.6	33	м	105	11.8	15.8	144.1	11.9
77	81.2	26	м	106	10.9	18.4	133.3	15.1
78	79.5	24	м	110	12.0	19.7	98.3	19.8
79	73.3	39	м	110	11.5	6.7	49.8	12.3
80	80.1	30	м	104	9.9	11.6	105.5	10.8

Таблица 23. Нормализирани резултати за uNGAL при здравите контроли (n=80)

#	Възраст	Пол	U_{Creat} mg/dL	uNGAL ng/mL	uNGAL/U_{Creat} ng/mg
1	20	ж	160.6	53.5	33.31
2	23	ж	186.7	55.0	29.46
3	23	ж	192.3	61.3	31.88
4	30	ж	190.0	9.3	4.89
5	36	ж	156.1	39.2	25.11
6	37	ж	159.5	45.2	28.34
7	37	ж	193.4	10.2	5.27
8	37	ж	176.5	62.4	35.35
9	37	ж	191.2	16.8	8.79
10	24	ж	176.5	25.3	14.33
11	40	ж	174.2	41.3	23.71
12	40	ж	153.8	30.1	19.57
13	42	ж	190.0	29.1	15.32
14	40	ж	174.2	48.3	27.72
15	39	ж	157.2	14.6	9.29
16	45	ж	187.8	47.5	25.29
17	45	ж	157.2	52.2	33.21
18	47	ж	159.5	21.6	13.54
19	20	ж	183.3	36.8	20.08
20	25	ж	175.3	59.8	34.11
21	38	ж	178.7	49.6	27.76
22	41	ж	164.0	28.7	17.50
23	42	ж	151.6	51.3	33.84
24	46	ж	192.3	36.1	18.77
25	28	ж	185.5	15.9	8.57
26	30	ж	179.9	26.3	14.62
27	31	ж	165.2	54.9	33.23
28	25	ж	181.0	52.3	28.90
29	22	ж	178.7	58.1	32.51
30	29	ж	168.6	10.2	6.05
31	30	ж	139.1	8.6	6.18
32	34	ж	161.7	55.3	34.20
33	35	ж	144.8	11.5	7.94
34	41	ж	152.7	65.3	42.76
35	40	ж	157.2	24.6	15.64
36	33	ж	142.3	15.8	11.10
37	25	ж	187.8	48.6	25.88
38	24	ж	173.1	55.6	32.12
39	24	ж	191.1	22.8	11.93
40	38	ж	139.1	13.1	9.42
1	36	м	97.3	10.6	10.89
2	22	м	89.4	12.6	14.09
3	21	м	108.6	7.9	7.27
4	23	м	106.3	10.9	10.25
5	22	м	114.3	11.4	9.97
6	22	м	119.9	9.9	8.26
7	23	м	100.7	12.9	12.81
8	29	м	130.1	20.1	15.45
9	21	м	92.8	19.6	21.12

10	34	м	136.9	17.8	13.00
11	21	м	96.2	10.3	10.71
12	27	м	134.6	22.3	16.57
13	41	м	109.7	13.8	12.58
14	22	м	90.5	11.2	12.38
15	22	м	102.9	10.3	10.01
16	23	м	133.5	11.2	8.39
17	40	м	143.7	13.9	9.67
18	39	м	131.2	17.8	13.57
19	21	м	115.4	18.3	15.86
20	21	м	90.5	9.2	10.17
21	22	м	86.0	12.0	13.95
22	23	м	114.3	13.3	11.64
23	27	м	141.4	20.9	14.78
24	34	м	123.3	21.7	17.60
25	34	м	89.4	19.0	21.25
26	28	м	96.1	16.9	17.59
27	37	м	102.9	13.2	12.83
28	24	м	119.9	19.0	15.85
29	41	м	100.7	18.1	17.97
30	33	м	99.6	14.2	14.26
31	30	м	105.2	16.9	16.06
32	28	м	116.5	16.6	14.24
33	28	м	133.5	24.8	18.58
34	22	м	145.9	11.1	7.61
35	39	м	119.9	6.3	5.25
36	33	м	133.5	15.8	11.84
37	26	м	123.3	18.4	14.92
38	24	м	135.8	19.7	14.51
39	39	м	130.1	6.7	5.15
40	30	м	112.0	11.6	10.36

Таблица 24. Нормализирани резултати за uKIM-1 при здравите контроли (n=80)

#	Възраст	Пол	U_{Creat} mg/dL	uKIM-1 pg/mL	uKIM-1/U_{Creat} ng/mg
1	20	ж	160.6	99.8	0.062
2	23	ж	186.7	116.8	0.063
3	23	ж	192.3	230.1	0.120
4	30	ж	190.0	98.5	0.052
5	36	ж	156.1	185.3	0.119
6	37	ж	159.5	128.0	0.080
7	37	ж	193.4	155.0	0.080
8	37	ж	176.5	294.3	0.167
9	37	ж	191.2	157.3	0.082
10	24	ж	176.5	268.1	0.152
11	40	ж	174.2	75.4	0.043
12	40	ж	153.8	205.6	0.134
13	42	ж	190.0	123.9	0.065
14	40	ж	174.2	188.2	0.108
15	39	ж	157.2	170.9	0.109
16	45	ж	187.8	131.2	0.070
17	45	ж	157.2	180.3	0.115
18	47	ж	159.5	63.1	0.040
19	20	ж	183.3	144.4	0.079
20	25	ж	175.3	268.1	0.153
21	38	ж	178.7	236.1	0.132
22	41	ж	164.0	317.4	0.194
23	42	ж	151.6	68.2	0.045
24	46	ж	192.3	250.6	0.130
25	28	ж	185.5	240.8	0.130
26	30	ж	179.9	270.3	0.150
27	31	ж	165.2	288.6	0.175
28	25	ж	181.0	195.2	0.108
29	22	ж	178.7	144.1	0.081
30	29	ж	168.6	255.5	0.152
31	30	ж	139.1	210.6	0.151
32	34	ж	161.7	98.8	0.061
33	35	ж	144.8	276.3	0.191
34	41	ж	152.7	155.6	0.102
35	40	ж	157.2	222.9	0.142
36	33	ж	142.3	280.6	0.197
37	25	ж	187.8	112.6	0.060
38	24	ж	173.1	161.0	0.093
39	24	ж	191.1	102.4	0.054
40	38	ж	139.1	201.8	0.145
41	36	м	97.3	131.0	0.134
42	22	м	89.4	120.9	0.135
43	21	м	108.6	168.4	0.155
44	23	м	106.3	211.3	0.198

45	22	м	114.3	75.4	0.066
46	22	м	119.9	95.6	0.080
47	23	м	100.7	163.4	0.162
48	29	м	130.1	69.9	0.054
49	21	м	92.8	90.4	0.157
50	34	м	136.9	146.0	0.083
51	21	м	96.2	166.8	0.173
52	27	м	134.6	25.3	0.019
53	41	м	109.7	98.9	0.090
54	22	м	90.5	63.3	0.070
55	22	м	102.9	156.4	0.152
56	23	м	133.5	203.0	0.152
57	40	м	143.7	188.1	0.131
58	39	м	131.2	175.5	0.134
59	21	м	115.4	160.7	0.139
60	21	м	90.5	218.2	0.241
61	22	м	86.0	144.1	0.167
62	23	м	114.3	62.9	0.055
63	27	м	141.4	49.5	0.035
64	34	м	123.3	190.2	0.154
65	34	м	89.4	141.2	0.158
66	28	м	96.1	48.7	0.051
67	37	м	102.9	113.2	0.110
68	24	м	119.9	69.3	0.058
69	41	м	100.7	101.4	0.101
70	33	м	99.6	96.1	0.096
71	30	м	105.2	115.3	0.110
72	28	м	116.5	131.6	0.113
73	28	м	133.5	202.3	0.152
74	22	м	145.9	66.0	0.045
75	39	м	119.9	98.6	0.082
76	33	м	133.5	144.1	0.108
77	26	м	123.3	133.3	0.108
78	24	м	135.8	98.3	0.072
79	39	м	130.1	49.8	0.038
80	30	м	112.0	105.5	0.094

Таблица 25. Нормализирани стойности за uIL-18 при здравите контроли (n=80)

#	Възраст	Пол	U_{Creat} mg/dL	uIL-18 pg/mL	uIL-18/U_{Creat} pg/mg
1	20	ж	160.6	17.6	10.96
2	23	ж	186.7	19.4	10.39
3	23	ж	192.3	16.3	8.48
4	30	ж	190.0	6.8	3.58
5	36	ж	156.1	18.1	11.60
6	37	ж	159.5	13.7	8.59
7	37	ж	193.4	10.5	5.43
8	37	ж	176.5	9.8	5.55
9	37	ж	191.2	21.3	11.14
10	24	ж	176.5	7.6	4.31
11	40	ж	174.2	12.0	6.89
12	40	ж	153.8	7.6	4.94
13	42	ж	190.0	14.1	7.42
14	40	ж	174.2	25.3	14.52
15	39	ж	157.2	11.5	7.32
16	45	ж	187.8	18.6	9.90
17	45	ж	157.2	24.3	15.46
18	47	ж	159.5	16.3	10.22
19	20	ж	183.3	9.5	5.18
20	25	ж	175.3	21.1	12.09
21	38	ж	178.7	12.9	7.22
22	41	ж	164.0	8.9	5.43
23	42	ж	151.6	21.3	14.05
24	46	ж	192.3	18.1	9.41
25	28	ж	185.5	11.9	6.42
26	30	ж	179.9	14.3	7.95
27	31	ж	165.2	10.9	6.60
28	25	ж	181.0	18.0	9.94
29	22	ж	178.7	10.2	5.71
30	29	ж	168.6	15.8	9.37
31	30	ж	139.1	16.0	11.50
32	34	ж	161.7	21.3	13.17
33	35	ж	144.8	19.5	13.47
34	41	ж	152.7	22.0	14.41
35	40	ж	157.2	17.6	11.20
36	33	ж	142.3	15.2	10.68
37	25	ж	187.8	19.1	10.17
38	24	ж	173.1	8.9	5.14
39	24	ж	191.1	11.2	5.86
40	38	ж	139.1	21.8	15.67
41	36	м	97.3	14.3	14.70
42	22	м	89.4	11.3	12.64
43	21	м	108.6	19.8	18.23
44	23	м	106.3	15.6	14.68

45	22	м	114.3	18.3	16.01
46	22	м	119.9	14.9	12.43
47	23	м	100.7	11.3	11.22
48	29	м	130.1	22.1	16.99
49	21	м	92.8	8.6	9.27
50	34	м	136.9	24.2	17.68
51	21	м	96.2	23.1	24.01
52	27	м	134.6	13.6	10.10
53	41	м	109.7	24.0	21.88
54	22	м	90.5	15.2	16.80
55	22	м	102.9	22.1	21.48
56	23	м	133.5	12.6	9.44
57	40	м	143.7	20.6	14.34
58	39	м	131.2	13.7	10.44
59	21	м	115.4	15.7	13.60
60	21	м	90.5	22.4	24.75
61	22	м	86.0	19.3	22.44
62	23	м	114.3	25.9	22.66
63	27	м	141.4	10.5	7.43
64	34	м	123.3	18.2	14.76
65	34	м	89.4	20.3	22.71
66	28	м	96.1	6.4	6.66
67	37	м	102.9	18.6	18.08
68	24	м	119.9	9.1	7.59
69	41	м	100.7	12.9	12.81
70	33	м	99.6	18.7	18.76
71	30	м	105.2	14.7	13.97
72	28	м	116.5	21.6	18.54
73	28	м	133.5	24.3	18.20
74	22	м	145.9	6.1	4.18
75	39	м	119.9	7.0	5.84
76	33	м	133.5	11.9	8.91
77	26	м	123.3	15.1	12.25
78	24	м	135.8	19.8	14.58
79	39	м	130.1	12.3	9.45
80	30	м	112.0	10.8	9.64

Библиография:

1. Буева А, Белчева О, Митева П и др. Генетика на бъбречни аномалии.-Уронет. 2012;1:15-23.

2. Калбурова Ф, Робева Р, Минкова В и др. Лекарствена болест във връзка с употреба на нестероидни противовъзпалителни средства.-Вътр. болести. 1991;30(1):83-86.

3. Abosaif NY, Tolba YA, Heap M, et al. The outcome of acute renal failure in the intensive care unit according to RIFLE: model application, sensitivity, and predictability.-American Journal of Kidney Diseases. 2005; 46(6):1038-1048.

4. Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure.-N Engl J Med. 2007; 357:797-805.

5. Adiyanti SS, Loho T. Acute Kidney Injury (AKI) biomarker.-Acta Med Indones. 2012;44(3):46-55.

6. Askenazi DJ, Ambalavanan N, Goldstein SL. Acute kidney injury in critically ill newborns: What do we know? What do we need to learn?-Pediatric Nephrology. 2009;24(2):265-274.

7. Bagshaw SM, George C, Gibney RTN, et al. A multi-center evaluation of early acute kidney injury in critically ill trauma patients.-Renal Failure. 2008; 30(6):581-589.

8. Bagshaw SM, Laupland KB, Doig CJ, et al. Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population-based study.-Crit Care. 2005;9:R700-709.

9. Bailly V, Zhang Z, Meier W, et al. Shedding of Kidney Injury Molecule-1, a Putative Adhesion Protein Involved in Renal Regeneration, - The Journal of Biological Chemistry, 277, 2002, 39739-39748.

10. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA 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.-Critical Care. 2004;8(4):204-212.

11. Bellomo R, Kellum John A, Ronco C. Acute kidney injury.-The Lancet. 2012;380(8):756–766.

12. Benes J, Chvojka J, Sykora R, et al. Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury: an experimental study.-Crit Care. 2011;15:R256.

13. Bennett M, Dent CL, Ma Q, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: A prospective study.-Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3(3):665-673.

14. Benoit DD, Hoste EA. Acute kidney injury in critically ill patients with cancer.-Crit Care Clin. 2010;26:151-179.

15. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage.-American Journal of Kidney Diseases. 2008;52(3):595-605.

16. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure.-J Am Soc Nephrol. 2003;14:2199-210.

17. Bonventre JV, Yang L. Kidney injury molecule-1.-Curr Opin Crit Care, 2010, (Epub ahead of print).

18. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more.-Nephrol Dial Transplant. 2009;24:3265-3268.

19. Case J, Khan S, Khalid R, et al. Epidemiology of Acute Kidney Injury in the Intensive Care Unit.-Critical Care Research and Practice. 2013;Article ID 479730-9p.

20. Che M, Xie B, Xue S, et al. Clinical usefulness of novel biomarkers for the detection of acute kidney injury following elective cardiac surgery.-Nephron Clin Pract. 2010;115(1):c66-72.

21. Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. Acute Kidney Injury, Mortality, Length of Stay, and Costs in Hospitalized Patients.-JASN. 2005; 16(11):3365-3370.

22. Cholongitas E, Calvaruso V, Senzolo M, et al. RIFLE classification as predictive factor of mortality in patients with cirrhosis admitted to intensive care unit.-Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2009; 24(10):1639-1647.

23. Chua HR, Glassford N, Bellomo R. Acute kidney injury after cardiac arrest.-Resuscitation. 2012;83:721-727.

24. Clifton MC, Corrent C, Strong RK. Siderocalins: siderophore-binding proteins of the innate immune system.-BioMetals. 2009;22(8):557-564.

25. Coca SG, Bauling P, Schifftner T, et al. Contribution of acute kidney injury toward morbidity and mortality in burns: a contemporary analysis.-American Journal of Kidney Diseases. 2007; 49(4):517-523.

26. Coca SG, Peixoto AJ, Garg AX, et al. The prognostic importance of a small acute decrement in kidney function in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis.-Am J Kidney Dis. 2007;50:712-720.

27. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Rarikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review.-Kidney Int. 2008;73:1008-1016.

28. Cohen SD, Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury in patients with human immunodeficiency virus infection.-Curr Opin Crit Care. 2008;14:647-653.

29. Constantin J-M, Futier E, Perbet S, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: a prospective study.-J Crit Care. 2010;25(1):176.e1-6.

30. Cruz DN, Bolgan I, Perazella MA, et al. North east Italian prospective hospital renal outcome survey on acute Kidney injury (NEIPHROS-AKI): targeting the problem with the RIFLE criteria.-Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2007; 2(3):418-425.

31. Cruz DN, de Cal M, Garzotto F, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early biomarker for acute kidney injury in an adult ICU population.-Int Care Med. 2010;36(3):444-451.

32. Dalboni MA, Quinto BM, Grabulosa CC, et al. Tumour necrosis factor-alpha plus interleukin-10 low producer phenotype predicts acute kidney injury and death in intensive care unit patients.-Clin Exp Immunol. 2013;173:242-249.

33. Damman K, van Deursen VM, Navis G, et al. Increased central venous pressure is associated with impaired renal function and mortality in a broad spectrum of patients with cardiovascular disease.-J Am Coll Cardiol. 2009;53:582-588.

34. de Geus HR, Bakker J, Lesaffre EM, le Noble JL. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin at ICU admission predicts for acute kidney injury in adult patients.-Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(7):907-914.

35. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, et al. Plasma NGAL predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study.-Crit Care. 2007;11(6):R127.

36. Devarajan P, Krawczeski CD, Nguyen MT, et al. Proteomic identification of early biomarkers of acute kidney injury after cardiac surgery in children.- Am J Kidney Dis. 2010;56:632-642.

37. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease.-Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation. 2008;68:89-94.

38. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury.-Biomarkers Med. 2010;4(2):265-280.

39. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury.-J Am Soc Nephrol. 2006;17(6):1503-1520.

40. Drawz PE, Miller RT, Shegal AR. Predicting hospital-acquired acute kidney injury- a case-controlled study.-Ren Fail. 2008;30:848-855.

41. Edelstein CL, Hoke TS, Somerset H et al. Proximal tubules from caspase-1-deficient mice are protected against hypoxia-induced membrane injury.–Nephrol Dial Transplant. 2007;22(4):1052-1061.

42. Edelstein CL. Urine IL-18 is a Biomarker of Early Acute Kidney Injury (AKI).-Recent Patents on Biomarkers. 2013;2(3):196-201.

43. Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ, et al. Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function.-Kidney Int. 2011;79(10): 1119-30.

44. Englberger L, Suri RM, Connolly HM, et al. Increased risk of acute kidney injury in patients undergoing tricuspid valve surgery.-European Journal of CardioThoracic Surgery. 2013;43(5):993-999.

45. Englberger L, Suri RM, Li Z, et al. Clinical accuracy of RIFLE and Acute Kidney Injury Network (AKIN) criteria for acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery.-Critical Care. 2011;15(1):R16.

46. FDA News. FDA, European medicines agency to consider additional test results when assessing new drug safety collaborative effort by FDA and EMEA expected to yield additional safety data. – FDA News, 2008.

47. Finlay S, Bray B, Lewington AJ, et al. Identification of risk factors associated with acute kidney injury in patients admitted to acute medical units.-Clin Med. 2013;13:233-238.

48. Frank AJ, Sheu CC, Zhao Y, et al. BCL2 genetic variants are associated with acute kidney injury in septic shock.-Crit Care Med. 2012;40:2116-2123.

49. Gammelager H, Christiansen SF, Johansen MB, et al. One-year mortality among Danish intensive care patients with acute kidney injury: a cohort study.-Critical Care. 2012;16:R124.

50. Garcia-Tsao G, Parikh CR, Viola A. Acute kidney injury in cirrhosis.-Hepatology. 2008;48:2064-2077.

51. Gines P, Schrier RW. Renal failure in cirrhosis.-N Engl J Med. 2009;361:1279-1290.

52. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al. The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition.-Molecular Cell. 2002;10(11):1033-1043.

53. Gomez H, Ince C, De Backer D, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury.-Shock. 2014;41:3-11.

54. Gustot T. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response.-Curr Opin Crit Care. 2011;17:153-159.

55. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis.-Am J Kidney Dis. 2009;54(6):1012-1024.

56. Haase N, Perner A, Hennings LI, Siegmund M, et al. Hydroxyethyl starch 130/0.38-0.45 versus crystalloid or albumin in patients with sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis.-BMJ. 2013;346:f839.

57. Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, et al. Novel and conventional serum biomarkers predicting acute kidney injury in adult cardiac surgery-a prospective cohort study.-Crit Care Med. 2009;37(2):553-560.

58. Haase-Fielitz A, Haase M, Bellomo R, et al. Genetic polymorphisms in sepsis- and cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury.-Contrib Nephrol. 2007;156:75-91.

59. Han M, Li Y, Liu M, Cong B. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat.-BMC Nephrol. 2012;6:13-25.

60. Han WK, Bailly V, Abichandani R et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury.–Kidney Int. 2002;62:237-244.

61. Han WK, Wagener G, Zhu Y, et al. Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery.-Clin J Am Soc Nephrol. 2009;4(5):873-882.

62. Han WK, Waikar SS, Johnson A, et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury.-Kidney Int. 2008;73:863–869.

63. Hata N, Yokoyama S, Shinada T, et al. Acute kidney injury and outcomes in acute decompensated heart failure: evaluation of the RIFLE criteria in an acutely ill heart failure population.-European Journal of Heart Failure. 2010; 12(1):32-37.

64. He Z, Lu L, Altmann C et al. Interleukin-18 binding protein transgenic mice are protected against ischemic acute kidney injury.-American Journal of Physiology. 2008;295(5):1414-1421.

65. He Z, Dursun B, Oh DJ et al. Macrophages are not the source of injurious interleukin-18 in ischemic acute kidney injury in mice.-American Journal of Physiology. 2009;296(3):535-542.

66. Hoste EAJ and Schurgers M. Epidemiology of Acute Kidney Injury: How Big is the Problem?-Critical Care Medicine. 2008;36(4):146-151.

67. Hoste EAJ, Clermont G, Kersten A, et al.RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis.-Critical Care. 2006;10(3):R73.

68. Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome.-N Engl J Med. 2011;364:1844-1854.

69. 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.

70. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, et al. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells.-J Clin Invest. 2008;118(5):1657-1668.

71. Ishikawa K, Bellomo R, May CN. The impact of intrarenal nitric oxide synthase inhibition on renal blood flow and function in mild and severe hyperdynamic sepsis.-Crit Care Med. 2011;39:770-776.

72. Jaber BL, Pereira BJ, Bonventre JV, et al. Polymorphism of host response genes: implications in the pathogenesis and treatment of acute renal failure.-Kidney Int. 2005;67:14-33.

73. Jacobs R, Honore PM, Joannes-Boyau O, et al. Septic acute kidney injury: the culprit is inflammatory apoptosis rather than ischemic necrosis.-Blood Purif. 2011;32:262-265.

74. Joannidis M, Druml W, Forni LG, et al. Prevention of acute kidney injury and protection of renal function in the intensive care unit. Expert opinion of the Working Group for Nephrology, ESICM.-Intensive Care Med. 2010;36:392-411.

75. Joannidis M, Metnitz B, Bauer P, et al. Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database.-Intensive Care Medicine. 2009;35(10):1692-1702.

76. Kalousek I, Röselová P, Otevrelová P, NGAL-neutrophil gelatinase associated lipocalin in biochemistry, physiology and clinical praxis.-Cas Lek Cesk. 2006;145(5):373-6.

77. Kellum JA, Levin N, Bouman C, et al. Developing a Consensus Classification System for Acute Renal Failure.-Current Opinion in Critical Care. 2002;8(6):509-514.

78. Kjeldsen L, Cowland BJ, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse.-Biochim Biophys Acta. 2000;1482(1-2):272-83.

79. Knotek M, Rogachev B, Wang W, et al. Endotoxemic renal failure in mice: Role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase.-Kidney Int. 2001;59:2243-2249.

80. Koyner J, Bennett M, Worcester E, et al. Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery.- Kidney Int. 2008;74(8):1059-1069.

81. Krawczeski CD, Goldstein SL, Woo JG, et al. Temporal relationship and predictive value of urinary acute kidney injury biomarkers after pediatric cardiopulmonary bypass.-J Am Coll Cardiol. 2011;58(22):2301-2309.

82. Krawczeski CD, Woo JG, Wang Y, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentrations predict development of acute kidney injury in neonates and children after cardiopulmonary bypass.-J Pediatr. 2011;158(6): 1009-1015.

83. Kuitunen A, Vento A, Suojaranta-Ylinen R, et al. Acute renal failure after cardiac surgery: evaluation of the RIFLE classification.-Annals of Thoracic Surgery. 2006; 81(2):542-546.

84. Lameire N, Hoste E. Reflections on the definition, classification, and diagnostic evaluation of acute renal failure [Editorial].-Curr Opin Crit Care. 2004;10:468-75.

85. Lamiere N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure.-Lancet. 2005; 365:417-430.

86. Langenberg C, Bagshaw SM, May CN, et al. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review.-Crit Care. 2008;12:R38.

87. Langenberg C, Wan L, Egi M, et al. Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury.-Intensive Care Med. 2007;33:1614-1618.

88. LeDoux D, Astiz ME, Carpati CM, et al. Effects of perfusion pressure on tissue perfusion in septic shock.-Crit Care Med. 2000;28:2729-2732.

89. Lerolle N, Guérot E, Faisy C, et al. Renal failure in septic shock: predictive value of Doppler-based renal arterial resistive index.-Intensive Care Medicine. 2006; 32(10):1553-1559.

90. Levey AS, Greene T, Kusek JW et al. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine.-J Am Soc Nephrol. 2000;11:115A.

91. Li X, Liu M, Bedja D, et al. Acute renal venous obstruction is more determinal to the kidney than arterial occlusion: implication for murine models of acute kidney injury.-Am J Physiol Renal Physiol. 2012;302:F519-525.

92. Liangos O, Balakrishnan VS, Pereira BJ, et al. Cytokine single nucleotide polymorphism. Role in acute renal failure.-Contrib Nephrol. 2004:144:63-75.

93. Liangos O, Periyanayagam MC, Vaidya VS, et al. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure.-J Am Soc Nephrol. 2007;18:904-912.

94. Liangos O, Tighiouart H, Perianayagam MC, et al. Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass.- Biomarkers. 2009;14(6):423-431.

95. Lieske JC. Biomarkers for acute kidney injury: Where are we today? Where should we go?-Clin Chem. 2014;60(2):294-300.

96. Liu Y, Guo J, Zhang J, et al. Urinary interleukin 18 for detection of acute kidney injury: a meta-analysis.-Am J Kidney Dis. 2013;62(6):1058-1067.

97. Lopes JA, Jorge S, Neves FC, et al. Acute renal failure in severely burned patients.-Resuscitation. 2007; 73(2):318.

98. Lopes JA, Jorge S, Resina C, et al. Prognostic utility of RIFLE for acute renal failure in patients with sepsis.-Critical Care. 2007; 11, article no. 408.

99. Loutzenhiser R, Griffin K, Williamson G, et al. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms.-Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006;290:R1153-1167.

100. Lu Jc, Coca SG, Patel UD, et al. Searching for genes that matter in acute kidney injury: a systematic review.-Clin J Am Soc Nephrol. 2009;4:1020-1031.

101. Machado MDN, Miranda RC, Takakura IT, et al. Acute kidney injury after on-pump coronary artery bypass graft surgery.-Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2009; 93(3):230-252.

102. Maisel AS, Mueller C, Fitzgerald R et al. Prognostic utility of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with acute heart failure: The NGAL EvaLuation Along with B-type NaTriuretic Peptide in acutely decompensated heart failure (GALLANT) trial.-European Journal Of Heart Failure. 2011;13(8):846-851.

103. Makris K, Markou N, Evodia E, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as an early marker of acute kidney injury in critically ill multiple trauma patients.-Clin Chem Lab Med. 2009;47(1):79-82.

104. Makris K, Rizos D, Kafkas N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a new biomarker in laboratory medicine.-CCLM. 2012;50(9):1519-1532.

105. Mårtensson J, Bell M, Oldner A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in adult septic patients with and without acute kidney injury.- Intensive Care Med. 2010;36(8):1333-1340.

106. May CN, Ishikawa K, Wan L, et al. Renal bioenergetics during early gram-negative mammalian sepsis and angiotensin II infusion.-Intensive Care Med. 2012;38:886-893.

107. McCullough PA, Kellum JA, Haase M, et al. Pathophysiology of the cardiorenal syndromes: executive summary from the eleventh consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI).-Contrib Nephrol. 2013;182:82-98.

108. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery: The Effect of Baseline Renal Function on Diagnostic Performance.-Clin J Am Soc Nephrol. 2010;5(2):211-219.

109. Medve L, Antek C, Paloczi B, et al. Epidemiology of acute kidney injury in Hungarian intensive care units: a multicenter, prospective, observational study.-BMC Nephrol. 2011;12:43.

110. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.-Critical Care. 2007;11(2):R31.

111. Mehta RL, Pascual MT, Soroko BR, et al. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience.-Kidney Int. 2004;66:1613-1621.

112. Melnikov VY, Ecder T, Fantuzzi G, et al. Impaired IL-18 processing protects caspase-1 deficient mice from ischemic acute renal failure.-J Clin Invest. 2001;107:1145-1152.

113. Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B et al. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1 and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice.-The Journal of Clinical Investigation. 2002;110(8):1083-1091.

114. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia.-N Engl J Med. 2007;357(13):1316-1325.

115. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury following cardiac surgery.-The Lancet.2005;365(9466):1231-1238.

116. Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin.-J Am Soc Nephrol. 2004;15(12):3073-3082.

117. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure.-Kidney Int. 2004;66:496-499.

118. Moreau R, Lebrec D. Acute renal failure in patients with cirrhosis: perspectives in the age of MELD.-Hepatology. 2003;37:233-243.

119. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury.-J Clin Invest. 2005;115(3):610–621.

120. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage.-Kidney Int. 2007;71(10):967-970.

121. Murray PT, Mehta A, Shaw A, et al. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference.-Kidney Int. 2014;85(3):513-521.

122. Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, et al. Genetic, Inflammatory Markers of Sepsis I. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival.-Kidney Int. 2010;77:527-535.

123. Murugan R, Kellum A. Acute Kidney Injury: What's the Prognosis?-Nature Reviews Nephrology. 2011;7:209-217.

124. Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, et al. Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care.-N Engl J Med. 2012;367:1901-1911.

125. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury.-Pediatr Nephrol. 2008;23(12):2151-2157.

126. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury.-Ann Intern Med. 2008;148(11):810-819.

127. Nickolas TL, Schmidt-Ott KM, Canetta P, et al. Diagnostic and prognostic stratification in the emergency department using urinary biomarkers of nephron damage. - J Am Coll Cardiol. 2012 (Epub ahead of print).

128. Niemann CU, Walia A, Waldman J, et al. Acute kidney injury during liver transplantation as determined by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. -Liver Transplant. 2009;15(12):1852-1860.

129. Ostermann M, Chang RW. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE.-Crit Care Med. 2007;35:1837-1843.

130. Palmieri T, Lavrentieva A, Greenhalgh DG. Acute kidney injury in critically ill burn patients. Risk factors, progression and impact on mortality.-Burns. 2010; 36(2):205-211.

131. Paragas N, Qui A, Zhang Q, et al. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time.-Nat Med. 2011;17(2):216-222.

132. Parazella MA. Drug use and nephrotoxicity in the intensive care unit.-Kidney Int. 2012;81:1172-1178.

133. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, et al. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit.-J Am Soc Nephrol. 2005;16:3046-3052.

134. Parikh CR, Coca SG, Thiessen-Philbrook H, et al. Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery.-J Am Soc Nephrol. 2011;22(9):1748-1757.

135. Parikh CR, Devarajan P, Zappitelli M, et al. Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after pediatric cardiac surgery.-J Am Soc Nephrol. 2011;22(9):1737-1747.

136. Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, et al. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis.-Am J Kidney Dis. 2004;43:405-414.

137. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery.-Kidney Int. 2006;70(1):199-203.

138. Perel P, Roberts I, Ker K. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients.-Cochrane Database Syst Rev. 2013;2:CD000567.

139. Perry TE, Muehlschlegel JD, Liu KY, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute postoperative kidney injury in adult cardiac surgical patients.-Anesth Analg. 2010;110(6):1541-1547.

140. Piccinni P, Cruz D, Gramaticopolo S, et al. Prospective multicenter study on epidemiology of acute kidney injury in the ICU: a critical care nephrology Italian collaborative effort (NEFROINT).-Minerva Anestesiologica. 2011; 77: 1072-1083.

141. Prabhu A, Sujatha DI, Ninan B et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass.-Ann Vasc Surg. 2010;24(4):525-531.

142. Prowle JR, Molan MP, Horsney E, et al. Measurement of renal blood flow by phase-contrast magnetic resonance imaging during septic acute kidney injury: a pilot investigation.-Crit Care Med. 2012;40:1768-1776.

143. Ricci Z, Cruz DN, Ronco C. Classification and Staging of Acute Kidney Injury: Beyond the RIFLE and AKIN Criteria.-Nature Reviews Nephrology. 2011;7:201-208.

144. Ronco C. Cardiorenal syndromes: definition and classification.-Contrib Nephrol. 2010;164:33-38.

145. Rosner M, Portilla D, Okusa M. Analytic Reviews: Cardiac Surgery as a Cause of Acute Kidney Injury: Pathogenesis and Potential Therapies.-J Intensive Care Med. 2008;23(1):3-18.

146. Schetz M, Dasta J, Goldstein S, et al. Drug-induced acute kidney injury.-Curr Opin Crit Care. 2005;11:555-565.

147. Schinstock CA, Semert MH, Wagner SJ, et al. Urinalysis is more specific and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is more sensitive for early detection of acute kidney injury.-Nephrol.Dial.Transplant. 2013;28(5):1175-1185.

148. Schrier RW, Wang W, Poole B, et al. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy.-J Clin Invest. 2004;114:4-14.

149. Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, et al. The diagnostic accuracy of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the prediction of acute kidney injury in emergency department patients with suspected sepsis.-Ann Emerg Med. 2010;56(1):52-59.e1.

150. Shimada M, Johnson RJ, May WS, et al. A novel role for uric acid in acute kidney injury associated with tumor lysis syndrome.-Nephrol Dial Transplant. 2009;24:2960-2964.

151. Siew ED, Ware LB, Gebretsadik T, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin moderately predicts acute kidney injury in critically ill adults.-J Am Soc Nephrol. 2009;20(8):1823-1832.

152. Simsek A, Togcu V, Tasci AI, New Biomarkers for the Quick Detection of Acute Kidney Injury.-ISRN Nephrology. 2013, 394582.

153. Singer E, Elger A, Elitok S, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes.-Kidney Int. 2011;80(4):405-414.

154. Singer E, Marko L, Paragas N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications.-Acta Physiol (Oxf). 2013;207(4):663-672.

155. Sirvinskas E, Andrejaitiene J, Raliene L, et al. Cardiopulmonary bypass management and acute renal failure: risk factors and prognosis.-Perfusion. 2008; 23(6):323-327.

156. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, et al. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia.-Am J Physiol Renal Physiol. 2003;285:F191-198.

157. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis.-Am J Respir Crit Care Med. 2013;187:509-517.

158. Thakar CV, Christianson A, Freyberg R, et al. Incidence and outcomes of acute kidney injury in intensive care units: a Veterans Administration study.-Critical Care Medicine. 2009; 37(9):2552-2558.

159. Thakar CV, Liangos O, Yared JP, et al. ARF after open-heart surgery: Influence of gender and race.-Am J Kidney Dis. 2003;41:742-751.

160. The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Working Group, Definition and classification of acute kidney injury.-Kidney International. 2012;2:19-36.

161. Thuiller R, Favreau F, Celhay O, et al. Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy.-Transplantation. 2010;90:612-621.

162. Thurman JM, Lenderink AM, Royer PA, et al. C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion.-J Immunol. 2007;178:1819-1828.

163. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion.-Clin Immunol. 2007;123:7-13.

164. Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies.-Nat Biotechnol. 2010;28:478-485.

165. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans.-Clin Transl Sci. 2008;1(3):200-208.

166. Van Biesen W, Vanholder R, Lameire N. Defining Acute Renal Failure: RIFLE and Beyond. CJASN. 2006;1(6):1314-1319.

167. Van Timmeren MM, Vaidya VS, van Ree RM, et al. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients.-Transplantation. 2007;84(12):1625-1630.

168. Van Timmeren MM, van den Heuvel MC, Bailly V, Bakker SJL, van Goor H, Stegeman CA, Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease.-The Journal of Pathology. 2007;212(2):209-217.

169. Versteilen AM, Blaauw N, Di Maggio F, et al. rho-Kinase inhibition reduces early microvascular leukocyte accumulation in the rat kidney following ischemia-reperfusion injury: roles of nitric oxide and blood flow.-Nephron Exp Nephrol. 2011;118:e79-86.

170. Vidal MG, Ruiz Weisser J, Gonzalez F, et al. Incidence and clinical effects of intra-abdominal hypertension in critically ill patients.-Crit Care Med. 2008;36:1823-1831.

171. Wagener G, Gubitosa G, Wang S, et al. Urinary neutrophil-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery.-Am J Kidney Dis. 2008;52(3):425-433.

172. Wagener G, Jan M, Kim M, et al. Association between increases in urinary neutrophil-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery.-Anesthesiology. 2006;105(3):485-491.

173. Wan L, Langenberg C, Bellomo R, et al. Angiotensin II in experimental hyperdynamic sepsis.-Crit Care. 2009;13:R190.

174. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies.-Chest. 1997:112:676-692.

175. Wang J, Long Q, Zhang W et al. Protective effects of exogenous interleukin 18-binding protein in a rat model of acute renal ischemia-reperfusion injury.-Shock. 2012;37(3):333-340.

176. Washburn KK, Zappitelli M, Arikan AA, et al. Urinary Interleukin-18 is an Acute Kidney Injury Biomarker in Critically Ill Children.-Nephrol Dial Transplant. 2008;23:566-572.

177. Wen X, Murugan R, Peng Z, et al. Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective.-Contrib Nephrol. 2010;165:39-45.

178. Wheeler DS, Devarajan P, Ma Q, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock.-Crit Care Med. 2008;36(4):1297-1303.

179. Working group set up by the Finnish Medical Society Duodecim tFSoA, and the Finnish Society of Nephrologists. Acute Kidney Injury.-Current Care Guidelines. 2013.

180. Wu, H, Craft ML, Wang P. et al. IL-18 contributes to renal damage after ischemia-reperfusion.-Journal of American Society of Nephrology. 2008;19(12):2331-2341.

181. Yan XL, Li Q, Hou XT, et al. Postoperative acute renal failure in adult patients with cardiac surgery: evaluation of the RIFLE classification.-Zhonghua yi xue za zhi. 2009; 89(25):1766-1769.

182. Yegenaga I, Tuglular S, Ari E, et al. Evaluation of sepsis/systemic inflammatory response syndrome, acute kidney injury, and RIFLE criteria in two tertiary hospital intensive care units in Turkey.- Nephron. 2010; 115(4): c276–c282.

183. Zager RA, Gamelin LM. Pathogenetic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failure.-Am J Physiol. 1989;256:F446-455.

184. Zappitelli M, Washburn KK, Arikan AA, et al. Urine NGAL is an early marker of acute kidney injury in critically ill children.-Crit Care. 2007;11(4):R84.

185. Zarychanski R, Abou-Setta AM, Turgeon AF, et al. Association of hydroxyethyl starch administration with mortality and acute kidney injury in critically ill patients requiring volume resuscitation: a systematic review and meta-analysis.-JAMA. 2013;309:678-688.

186. Zhang PL, Rothblum LI, Han WK, et al., Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. - Kidney Int. 73, 2008, 608–614.

187. Zuk A, Bonventre JV, Brown D, et al. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postisdhemic rat kidney.-Am J Physiol. 1998;275:C711-731.