

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Катедра по вътрешни болести  
Клиника по нефрология**

# **ДИСЕРТАЦИЯ**

**Д-р Владислава Миленова Тодорова**

**СЕРУМНИ И УРИННИ БИОЛОГИЧНИ МАРКЕРИ  
ПРИ ОСТРО БЪБРЕЧНО УВРЕЖДАНЕ**



**София**

**2017**

## Съдържание

<b>1. Увод</b>	<b>8</b>
<b>2. Литературен обзор</b>	<b>10</b>
2.1. Патофизиология и развитие на остро бъбречно увреждане	12
2.1.1. Ишемия-реперфузия индуцирано остро бъбречно увреждане (ОБУ)	14
2.1.2. Септично ОБУ	15
2.1.3. Нефротоксини	17
2.1.4. Гломерулопатии	18
2.1.5. Васкулити	19
2.1.6. Кардиоренален синдром	20
2.1.7. Мултиплен миелом	21
2.1.8. ОБУ на трансплантиран бъбрек	22
2.2. Рискови фактори за развитие на ОБУ	23
2.3. Честота на ОБУ	25
2.4. Патофизиология на изострено хронично бъбречно заболяване (ХБЗ)	27
2.5. Характеристики на идеалните биомаркери за ОБУ	32
2.6. Неутрофилен гелатиназа асоцииран липокалин(NGAL)	35
2.6.1. Предимства на NGAL като биомаркер на ОБУ	38
2.6.2. Недостатъци на NGAL като биомаркер на ОБУ	39
2.7. Цистатин С (CysC)	40
2.7.1. Предимства на CysC като биомаркер на ОБУ	42
2.7.2. Недостатъци на CysC като биомаркер на ОБУ	43
2.8. N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаза (NAG)	45

2.8.1. Предимства на NAG като биомаркер на ОБУ	47
2.8.2. Недостатъци на NAG като биомаркер на ОБУ	48
2.9. Молекула за бъбречно увреждане-1 (KIM-1)	48
2.9.1. Предимства на KIM-1 като биомаркер на ОБУ	50
2.9.2. Недостатъци на KIM-1 като биомаркер на ОБУ	51
2.10. Интерлевкин-18 (IL-18)	51
2.10.1. Предимства на IL-18 като биомаркер на ОБУ	54
2.10.2. Недостатъци на IL-18 като биомаркер на ОБУ	54
2.10. Обобщение	55
<b>3. ЦЕЛ</b>	59
<b>4. ЗАДАЧИ</b>	59
<b>5. МАТЕРИАЛ</b>	60
5.1. Предмет на проучването	60
5.2. Място на проучването	60
5.3. Характер на наблюдението	60
5.4. Администриране на наблюдението	61
5.5. Характеристики на пациентските групи	63
<b>6. МЕТОДИ</b>	75
6.1. Анамнеза	75
6.2. Физикален статус	75
6.3. Ултразвуково изследване	75
6.4. Микробиологични изследвания	76
6.5. Лабораторни методи	76
6.6. Специфични лабораторни методи	77
6.7. Статистически методи	83
<b>7. РЕЗУЛТАТИ</b>	85
7.1. Представяне на резултатите по причини довели до влошаване на бъбречната функция	85
7.2. По продължителност на болничния престой	90
7.3. Усложнения по време на лечението	90

7.4. Промени в лабораторните показатели оценяващи бъбречната функция	91
7.5. Промени в нивата на sCysC, sNGAL, sIL-18, uKIM-1 и uNAG при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ	92
7.5.1. Проучване на диференциалната способност на изследваните биомаркери при пациентите с ОБУ и изострено хронично бъбречно заболяване	95
7.6. Сравнение на биомаркерите по пол при двете групи пациенти	102
7.6.1. Сравнение на биомаркерите между мъжете с ОБУ и изострено ХБЗ	103
7.6.2. Сравнение на биомаркерите между жените с ОБУ и изострено ХБЗ	104
7.6.3. Сравнение на биомаркерите по възрастови групи при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ	104
7.7. Сравнение на нивата на петте биомаркери по продължителност и степен на влошаване на изострено ХБЗ	106
7.7.1. Изследване нивата на биомаркерите по продължителност на изострено ХБЗ	106
7.7.2. Изследване нивата на биомаркерите по стадии на изострено ХБЗ	107
7.8. Корелации между петте биомаркери със серумния креатинин и гломерулна филтрация при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ	109
7.8.1. Корелация на петте биомаркери със серумния креатинин и гломерулна филтрация при цялата пациентска популация	109
7.8.2. Корелация на петте биомаркери със серумния креатинин и гломерулна филтрация при пациентите с ОБУ	111

7.8.3. Корелация на петте биомаркери със серумния креатинин и гломерулна филтрация при пациентите с изострено ХБЗ	112
7.9. Корелации на петте биомаркерите по между им, зависимост с други клинични и лабораторни показатели при болните с ОБУ и изострено ХБЗ	113
7.9.1. Корелации на биомаркерите по между им, зависимост с клинични и лабораторни показатели при пациентите с ОБУ	115
7.9.2. Корелации на биомаркерите по между им, зависимост с клинични и лабораторни показатели при пациентите с ХБЗ	118
7.10. Оценка на различията в нивата на биомаркерите при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ с различни причини за бъбречна увреда	120
7.10.1. Сравнение в нивата на биомаркерите при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ с различни причини за бъбречно увреждане	120
7.10.2. Сравнение на стойностите на петте биомаркера между отделните групи заболявания, довели до изява на ОБУ	123
7.10.3. Сравнение на стойностите на петте биомаркера между отделните групи заболявания, довели до изява на изострено ХБЗ	124
<b>8. ОБСЪЖДАНЕ</b>	<b>126</b>
<b>9. ИЗВОДИ</b>	<b>139</b>
<b>10. ПРИНОСИ</b>	<b>140</b>
<b>11. Приложения</b>	<b>141</b>
<b>12. Библиография</b>	<b>148</b>
<b>13. Публикации и участия в научни форуми</b>	<b>174</b>

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АКЕ инхибитори- Инхибитори на ангиотензин конвертиращия ензим

АН-Артериално налягане

АРБ-Ангиотензин рецепторни блокери

АХ-Артериална хипертония

БМ- Биологични маркери, Биомаркери

ДАН-Диастолно артериално налягане

ЗД-Захарен диабет

ИБС-Исхемична болест на сърцето

ТК-Тубулни клетки

ГН- Гломерулонефрити

ГФ- Гломерулна филтрация

КИН- Контраст индуцирана нефропатия

КС- Кортикостероиди

КРС-Кардиоренален синдром

ММ-Мултиплен миелом

НСПВС- Нестероидни противовъзпалителни средства

ОБН- Остра бъбречна недостатъчност

ОБУ- Остро бъбречно увреждане

ОИН- Остър интерстициален нефрит

ОМИ- Остър миокарден инфаркт

ОТН- Остра тубулна некроза

ПМ-Предсърдно мъждене

ПББ- Пункционна бъбречна биопсия

САН-Систолно артериално налягане

СУЕ-Скорост на утаяване на еритроцитите

СН-Сърдечна недостатъчност

ХБЗ- Хронично бъбречно заболяване

ХБН- Хронична бъбречна недостатъчност

ХД -Хемодиализа

ACS- abdominal compartment syndrome

ADQI- Acute Dialysis Quality Initiative Group

AKIN- Acute Kidney Injury Network

ANCA-Anti-neutrophil cytoplasmic antibody

ATP- Adenosine triphosphate

BMI -Индекс на телесната маса

CKD epi- Study Group and the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

CRP- C-reactive protein

GFR-Creatinine Clearance, Креатининов клирънс

CysC-Cystatin C

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay

EMEA- European Medicines Evaluation Agency  
GFR- Glomerular filtration rate  
ICNARC- Intensive Care National Adult Research Centre  
IL-6- Interleukin-6  
IL-18- Interleukin-18  
IQR-Interquartile range  
HES- hydroxyethyl starch  
HRP- пероксидаза от хрян  
KDIGO- Kidney Disease Improving Global Outcomes  
KIM-1- Kidney injury molecule-1  
LCDD- Light-Chain Deposition Disease (не-амилоидни моноклонални лековерижни депозити)  
MDRD- Modification of Diet in Renal Disease  
NAG- N-acetyl- $\beta$ -D-glucozaminidase  
NCEPOD- National Confidential Enquiry into Patient Outcome and Death  
NF- $\kappa$ B- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NGAL- Neutrophil gelatinase-associated lipocalin  
NO- Nitrogen oxide  
PGI<sub>2</sub>- Prostaglandin 2  
RAAS- Renin-angiotensin-aldosterone system  
RIFLE -Risk, Injury, Failure, Loss and End stage of renal disease  
Scr-serum creatinine (серумен креатинин)  
SD- Standard deviation  
SIRS- Systemic Inflammatory response Syndrome  
TLS- Tumor lysis syndrome  
TNF- $\alpha$ - Tumor necrosis factor alpha

## УВОД

Острото бъбречно увреждане (ОБУ) е сериозен клиничен проблем, който засяга значителна, хетерогенна популация пациенти. Свързано е с висока смъртност. През последните години понятието ОБУ измести термина острата бъбречна недостатъчност (ОБН). Това позволява да се обхванат и по-ранните етапи на бъбречна дисфункция до напреднало заболяване, налагащо бъбречно-заместителна терапия.

Литературните данни сочат честота на възникване на ОБУ при 5-7 % от хоспитализираните в общите хирургичните и терапевтични отделения. ОБУ е самостоятелна причина за смъртност в около 25% и достига над 50% в секторите за интензивни грижи [117]. Голямата вариация в показателите честота и смъртност вероятно отразява липсата на унифицирано определение за ОБУ [247].

ОБУ се дефинира като внезапна и продължителна загуба на бъбречна функция, причиняваща постоянно натрупване на азотни и неазот-съдържащи продукти и токсини. ОБУ се характеризира с бързо развитие на водно-електролитни и алкално-киселинни нарушения.

Тежките поражения при ОБУ обясняват нарастващия интерес на клиницистите за намирането на ефективна защита срещу последствията от заболяването, базирана върху ранното регистриране, оценка на клиничното протичане и прогноза, позволяващо провеждане на ефикасно лечение [203, 165]. Част от диагностичния проблем е липсата на биохимични маркери за ранна бъбречна увреда, които да са чувствителни, лесно приложими в клиничната практика и да имат висока предсказваща стойност. Серумният креатинин (Scr) вече не е достатъчно надежден показател за ранното диагностициране на ОБУ, тъй като стойностите му се влияят от редица екстраренални фактори, а клинично значимите промени в нивото му следват с 1-3 дни първоначалната структурна увреда. Този период е критичен, както в диагностично, така и в терапевтично отношение и е предпоставка за повишен риск от неблагоприятен клиничен изход.



Използването на надеждни биологични маркери (биомаркери) придобива все по-голяма значимост относно повишаване възможностите за ранната диагностика и изработване на прогностични анализи, способстващи създаване на диагностични и лечебни алгоритми, при пациенти с ОБУ. През последното десетилетие по-доброто разбиране за ранния патофизиологичен отговор на бъбрека към стресови фактори откри редица протеини в урина и серум. Те участват в регулацията на нови пътища и механизми, които модулират бъбречната увреда, очертавайки се като нови, неинвазивни биомаркери (БМ) за ОБУ и определяне на клиничния изход. Това са биомаркери за бъбречна функция: Цистатин С (CysC), Неутрофилен гелатиназа–асоцииран липокалин (NGAL), Интерлевкин-18 (IL-18) в серум и Молекула за бъбречно увреждане–1 (KIM-1) в урина; биологични маркери за структурна и клетъчна увреда: N-ацитил-бета-D-глюкозаминидаза (NAG) в урина. Проучването на тези нови, чувствителни и специфични БМ за бъбречна увреда допринасят за предвиждане прогресията на заболяването и спомагат за ефективността на терапията.

Някои от тези биологични маркери могат да се използват независимо, докато други са много по-достоверни в комбинация помежду си и с познаването на други клинични рискови фактори.

Напредъкът в анализа на генната експресия, хроматографията, мас - спектрометрията и развитието на сензитивни ензимно-свързани имуносорбенти съдействат за по-точно определяне и на други нови биологични маркери [126].

Този дисертационен труд се фокусира главно върху характеристиката както на нови, така и на доказани вече БМ, които определят и проследяват разнообразните патофизиологични процеси, поддържащи бъбречното заболяване. Оценени са различни класове БМ в серум и урина, включващи маркери за бъбречна функция, оксидативен стрес, структурна и клетъчна увреда, имунни отговори и фиброза.

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

ОБУ се дефинира като бързо понижаване скоростта на гломерулната филтрация (ГФ), настъпващо за часове или дни. Изявата на клиничния синдром, се характеризира с бързо намаляване на екскреторната бъбречна функция и последващо акумулиране на крайни азотни продукти [228]. Смъртността от ОБУ в интензивни и нефрологични отделения остава непроменена през последните десетилетия, въпреки напредъка в диагностиката и терапията.

В основата на ОБУ стоят намалената способност на бъбрека да екскретира азот-съдържащи продукти, нарушения в транспорта на електролити, поддържане на алкално-киселинното равновесие и вътресъдовия обем [53]. ОБУ е свързана с повишена заболеваемост, последваща тежка инвалидизация, смъртност и значителни лични и обществени разходи [57].

Работна група по качествена инициатива при остра диализа (Acute Dialysis Quality Initiative Group– ADQI) предлага стандартизиране на дефиницията за ОБУ при възрастни, използвайки нова система за класификация на клиничните симптоми и лабораторните маркери на бъбречна увреда [254, 17, 231, 247]. Консенсусната класификация RIFLE /Risk-Injury-Failure-Loss-End stage of renal disease/, определя три степени на тежест: риск (клас R) от развитие; увреда (клас I) и недостатъчност (клас F), както и два класа на клинично следствие (загуба или крайно бъбречно заболяване). RIFLE критериите са въз основа на изчисляване на серумния креатинин и са начин за оценка на последователните етапи в развитието на бъбречната недостатъчност (БН). Измерването на креатинина има твърде ниска чувствителност за регистриране на ранни вътребъбречни поражения [219, 254, 231, 23]. На таблица 1 е представена консенсусната класификация RIFLE.

Таблица 1. RIFLE критерии за стадиране на ОБУ

Категория	ГФ критерии (Креатининов клирънс)	Диуреза
Risk (риск)	↑Креатинин x 1.5 ↓ГФ с > 25%	<0.5 мл/кг/ч. x 6 ч.
Injury (увреждане)	↑Креатинин x 2 ↓ГФ с > 50%	<0.5 мл/кг/ч. x 12 ч.
Failure (недостатъчност)	↑Креатинин x 3 ↓ГФ с > 75%	<0.5 мл/кг/ч. x 24 ч. Анурия x12 ч.
Loss (загуба)	Персистиране на ОБН=пълна загуба на бъбречна функция за период от >4 седмици	
ESKD(терминална бъбречна недостатъчност)	Терминална БН за период > 3 месеца	

Adapted from Bellomo et al

Acute Kidney Injury Network (**AKIN**) модифицира RIFLE критериите. Тази стадираща система има висока чувствителност по отношение на лекостепенните увреждания на бъбречната функция (т.е. малки промени в изходните нива на серумния креатинин). За класифициране на пациента в един от трите стадия е необходимо да бъде изпълнен само един критерий (серумен креатинин или диуреза). Пациентите на бъбречно-заместващо лечение се класифицират в 3-ти стадий [232]. Таблица 2 представя AKIN критериите за стадиране на ОБУ.

Таблица 2 Класификация/стадиране на ОБУ според AKIN

Стадий	Серумен креатинин (SCr)	Диуреза
1	Нарастване на SCr $\geq 26.4 \mu\text{mol/l}$ или с $\geq 150\text{-}200\%$ ( $\geq 1.5\text{-}2$ x) спрямо изходния	$< 0.5 \text{ ml/kg/h} > 6\text{h}$
2	Нарастване на SCr $\geq 200\text{-}300\%$ ( $\geq 2\text{-}3$ x) спрямо изходния	$< 0.5 \text{ ml/kg/h} > 12\text{h}$
3	Нарастване на SCr $> 300\%$ ( $> 3$ x) спрямо изходния или SCr $\geq 354 \mu\text{mol/l}$ с остро покачване с $\geq 44 \mu\text{mol/l}$ .	$< 0.3 \text{ ml/kg/h} > 24\text{h}$ или анурия за 12h

### Патофизиология и развитие на ОБУ

ОБУ се характеризира с внезапна редуция на ГФ, както и с бавна и продължителна загуба на повечето засегнати нефрони. Главната причина е остра апоптоза на тубулните клетки (ТК). При 80 % от случаите на ОБУ се открива некроза на ТК, без наличието на остро заболяване на гломерулите или паренхима. В клиничната практика термините остра тубулна некроза (ОТН) и ОБУ погрешно се използват като синоними. Терминът ОТН се отнася за състояние, което се потвърждава чрез пункционна бъбречна биопсия (ПББ), чието провеждане често е невъзможно поради тежкото състояние на пациентите [244, 265, 231, 165, 99]. ОТН може да е резултат от кислороден дефицит, /настъпващ при шок, обширни хирургични интервенции върху големи кръвоносни съдове и сърцето, при бъбречна трансплантация/, септични или токсични бъбречни агенти /радиоконтрастни или антибактериални, антимикотични или цитотоксични медикаменти/ [219, 244, 99, 28, 250].

Обикновено ОБУ се диагностицира въз основа на натрупването на крайни продукти от азотната задръжка (урея и креатинин), и/или регистрирането на олигурия. Серумният креатинин е късен и недостатъчно надежден БМ за регистриране на ранна бъбречна дисфункция, тъй като серумните му нива се влияят изключително от

редица извънбъбречни фактори – възраст, пол, раса, мускулна маса, метаболизъм, прием на медикаменти, хранителен и хидратационен статус. Използването на Scr като показател при диагностициране на ОБУ не е достатъчно надеждно, тъй като той се покачва със значително закъснение след началната бъбречна увреда. При някои остри и изострени хронични бъбречни заболявания повишаване на нивото му може да не се регистрира дори 48-72 часа след началното бъбречно увреждане, поради компенсаторните възможности на бъбреците, усилената тубулна секреция на креатинин или други фактори. Едва при отпадане на повече от 50% от бъбречната функция, Scr се повишава. Концентрацията на креатинина не отразява реалното понижаване на скоростта на ГФ 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 [219, 183, 23, 60, 41]. При тежки заболявания като сепсис, стойностите на Scr намаляват и се оказват още по-ниски на фона на увеличеното вътресъдово налягане в резултат на целенасоченото лечение с вливане на течности.

Критично се явява и диференцирането на ОБУ от пререналната азотемия и хронична бъбречна недостатъчност (ХБН) в момента на постъпване на пациента, с цел навременно предприемане на адекватни терапевтични мерки [34]. Самостоятелното измерване нивото на Scr е късна индикация за настъпилите функционални промени, отразяващи степента на ГФ, което забавя оценката на важни структурни промени в бъбреците, в ранния стадий на ОБУ [219, 183, 24, 41, 60].

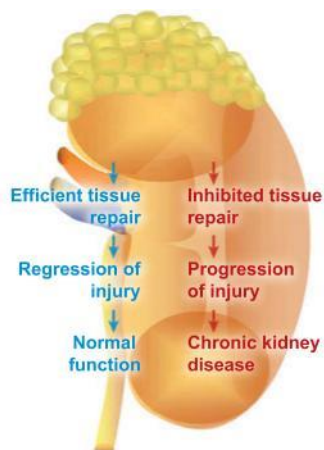
Епидемиологичните проучвания разкриват множество етиологични и рискови фактори за ОБУ и тяхната асоциация с хронично бъбречно заболяване (ХБЗ). Бъбречното увреждане е следствие от множество и различни етиологични фактори, включващи инфекции, токсини, исхемия, хипертония, генетични или метаболитни нарушения, автоимунни заболявания или отхвърляне на трансплантанта [219, 244, 99, 28, 250].

## Ишемия-реперфузия обусловено ОБУ

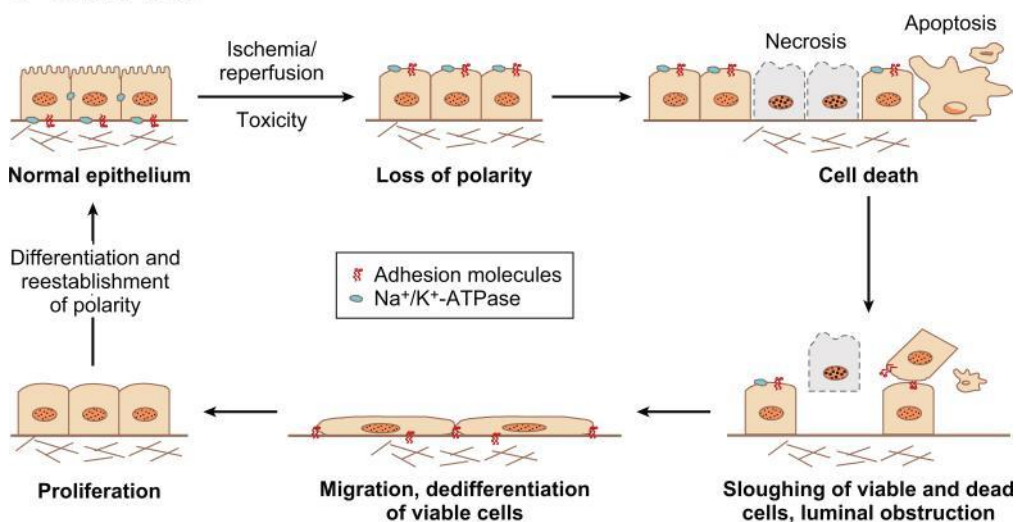
Множество са причините, които нарушават бъбречната авторегулация с последващо понижаване на перфузионното налягане и ГФ: остра циркулаторна слабост, хеморагии, периферна вазодилатация; тежка дехидратация с хиповолемия; влошена хемодинамика при сърдечна недостатъчност (СН), понижен кръвен дебит при артериална стеноза, съдово клампиране и венозна тромбоза [10, 137]. Бъбреците толерират продължителни периоди на изолирана топла ишемия, без да се стигне до тежко увреждане [59]. Възстановеният кръвоток следващ ишемията, допълнително уврежда бъбреците. Тези процеси се дефинират като ишемия-реперфузия обусловено ОБУ. Пониженото кръвоснабдяване води до вазоконстрикция, активиране на Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), стимулиране синтезата на ендотелин и Prostaglandin 2 (PGI<sub>2</sub>) [11]. Процесът се съпътства от изчерпването на енергийният субстрат Adenosine triphosphate (ATP) и понижено освобождаване на Nitrogen oxide (NO) от ендотела. Това предизвиква локален дисбаланс на вазоактивни субстанции [167]. На структурно ниво се намира разрушаване на цитоскелета [275] и вътреклетъчните връзки. Откъсването на ТК [219] формира отливки с последваща тубулна обструкция и обратен поток на гломерулния филтрат към капилярите. Последващото активиране на коагулационната каскада [239] и адхезивната способност на тромбоцитите [256] настъпва в резултат на дисбаланс на вазоконстрикторни и вазодилататорни фактори. Възпалителните клетки нарушават кръвния ток [235] чрез освобождаване на ензими и активиране на оксидативни процеси [240]. Възстановяването включва апоптоза [119] и десквамация на увредените ТК. Част от тях регенерират [264, 237] от недиференцирани епителни клетки, които колонизират засегнатата област.

## a Pathophysiology of AKI

- Vasoconstriction
- Desquamation of tubular cells
- Intraluminal tubular obstruction resulting in tubular backleak
- Local production of inflammatory mediators resulting in interstitial inflammation, small vessel obstruction, and local ischemia



## b Cellular level



Фигура 1. Схематично представяне на (а) патофизиологичните и (б) клетъчните механизми на ОБУ. Фигурата е изготвена от Vishal S. Vaidya,<sup>1</sup> Michael A. Ferguson,<sup>2</sup> Joseph V. Bonventre<sup>3</sup>.

## Септична ОБУ

Сепсис-индуцираната ОБУ е най-честата форма на ОБУ, наблюдавана при тежко болни и е свързана с висока смъртност [44]. Делът на засегнатите пациенти достига до 50% [124, 184].

Изявява се с тежко нарушаване на общото състояние, силно повишени маркери на възпаление и значителни отклонения на биохимичните показатели [24].

Скорошни експериментални проучвания предполагат, че патогенезата на сепсис-индуцираната ОБУ е доста по-сложна от изолираната хипоперфузия, свързана с понижаване на сърдечния дебит и хипотония [44]. Септична ОБУ може да възникне при ресусцитирани септични болни и наличие на бъбречна хиперемия при отсъствие на бъбречна хипоперфузия или исхемия.

Ключов фактор за възникване на ОБУ е бурната системна възпалителна реакция при сепсис [88]. Тя е свързана с освобождаване на множество инфламаторни медиатори, както от патогените, така и от имунните клетки, причиняващи увреда на ТК [175].

Тумор-некротизиращ фактор- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерлевкин-6 (IL-6) и левкотриени са фактори за развитие на ОБУ при сепсис, причиняващи смърт на ТК. Скорошни проучвания предполагат участието на NO в патогенезата на ендотоксичната ОБУ [127].

Мощната вазодилатация на еферентната артериола води до нарушена гломерулна хемодинамика [116], “локална хипотензия” и понижаване на ГФ [154]. В отговор се активира RAAS с последващо повишаване на бъбречната съдова резистентност и понижаване на кръвотока [145].

Повишената бъбречна съдова резистентност представлява ключов хемодинамичен фактор при септично ОБУ. Микроваскуларното увреждане (вазоконстрикция, оток на тъканите, левкоцитна и тромбоцитна адхезия, ендотелна дисфункция и формиране на микротормби) и/или повишено интраабдоминално налягане допринасят за повишаването на бъбречното съдово съпротивление [44].

“Унифицираната теория” за сепсис обяснява взаимодействието между възпалителния и оксидативния стрес, микроваскуларните нарушения и адаптивния отговор на тубулните епителни клетки към септичната увреда [84].



## Нефротоксини

Лекарствено индуцираната нефротоксичност е чест проблем в клиничната практика. Честотата на медикаментозно индуцираното ОБУ по литературни данни достига до 60% [223]. Патофизиологичният механизъм на лекарствено предизвиканото ОБУ е сложен и често се медира от увреждане на интрагломерулната хемодинамика, нарушена тубулна секреция, възпалително отлагане на кристали пикочна киселина, рабдомиолиза и тромбоцитна ангиопатия [223, 193, 218].

Най-уязвими за развитие на нефротоксичност са пациенти с подлежаща бъбречна увреда, СН, сепсис [223].

Лекарственото ОБУ може да бъде преренално (хемодинамично), интратенално и обструктивно. Пререналното ОБУ възниква в резултат на нарушена бъбречна хемодинамика и понижава ГФ. Най-често може да бъде причинено от Cyclosporin, НСПВС, Инхибитори на ангиотензин конвертиращия ензим (АКЕ-инхибитори) и Ангиотензин рецепторни блокери (АРБ) [179, 13]. Интратеналното лекарствено ОБУ протича като ОТН или остър интерстициален нефрит. Медикаментите предизвикващи ОТН имат директен цитотоксичен ефект върху ТК. Такива са аминогликозидите, амфотерицин В и цисплатин [13]. Лекарствата, водещи до развитие на остър интерстициален нефрит, включват аминогликозиди, бета лактами, хинолони, рифампин, сулфонамиди, ванкомицин, ацикловир, контрастни агенти, амфотерицин В [218, 192, 152].

Тези агенти предизвикват тубулна клетъчна увреда чрез промяна в митохондриалната функция с последващо нарушаване на тубулния транспорт и увеличена продукцията на свободни кислородни радикали [223].

Лекарствено обусловеното обструктивно ОБУ може да настъпи на различни нива на пикочните пътища-тубули, уретери.

Някои медикаменти като ампицилин, ципрофлоксацин, ацикловир, сулфонамиди, метотрексат, индинавир и триамтерен се асоциират с развитие на кристална нефропатия и обструкция на тубулите. Тя може да възникне като последица от химиотерапия с отлагане на кристали пикочна киселина и калциев фосфат [191, 66].

Статините могат да предизвикат рабдомиолиза в резултат на токсичен ефект върху миоцита [62, 109, 85]. Лекарства, асоцииращи се с тромботична ангиопатия са циклоспорин, митомицин С, антитромбоцитни агенти [198, 151].

В обобщение: не малко медикаменти са с потенциален нефротоксичен ефект и могат да причинят тежки случаи на ОБУ [156]: АКЕ инхибитори, диуретици, аминогликозиди, амфотерицин, ацикловир, калциневринови инхибитори (циклоспорин, такролимус), имуноглобулини, радиоcontrastни агенти, метформин, метотрексат, химиотерпевтични агенти, НСПВС, пептидогликани (ванкомицин) [6]. Особено важно е ранното разпознаване на медикаментозно индуцираното ОБУ за превенция на прогресията към крайна бъбречна увреда.

**Контраст-индуцирана нефропатия (КИН)** е третата по честота причина за развитие на ОБУ при хоспитализирани пациенти. КИН е състояние при което бъбречната дисфункция е резултат на вътресъдово приложение на контрастна материя в рамките на 3 дни от нейната употреба и липса на други етиологични фактори. Рискът от развитие на КИН за общата популация е много нисък. При наличие на рискови фактори той се увеличава над 20 % [4, 161, 263, 241].

## **Гломерулопатии**

Гломерулонефритите (ГН) са имуномедирирани заболявания, при които имунни комплекси активират каскадата на комплемента [105]. Възниква възпаление, причиняващо понижаване на гломерулния филтрационен капацитет и засягане функцията на целия нефрон [222]. Клиничната изява е развитие на нефритен и/или нефрозен (нефротичен) синдром, както и влошаване на бъбречната функция [233]. Нарушава се целостта на гломерулната бариера и се увеличава пропускливостта ѝ за белтък и еритроцити, които преминават в урината. Повишава се проксималната тубулна реабсорбция на Na, водеща до задръжка на вода и изява на отоци и хипертония [267]. Понижената ГФ води до олигурия и азотемия [7, 64].

БН може да се развие остро и да бъде преходна. Най-често диагнозата се поставя едва след влошаването на бъбречната функция, тъй като началните симптоми са лекостепенни до липсващи [233]. За избора на терапевтичен подход е определящо навременното разпознаване на остро от хронично влошаване на бъбречната функция [8].

## **Васкулити**

Анти-неутрофил цитоплазмените антитяло (ANCA) асоциирани васкулити са хетерогенна група заболявания. Бъбречното ангажиране при тях е често. Предиктор е на неблагоприятна прогноза и висока смъртност [262]. Обичайно бъбречното засягане се манифестира с развитие на некротизиращ ГН с полулуния, който води до бързо и в голям част от случаите до необратимо засягане на бъбречната функция [144]. По-често са ангажирани бъбречните съдове от среден калибър [123] с развитие на сегментна фибриноидна некроза на съдовите стени, неутрофилна и моноцитна инфилтрация с левкоцитоклазия, липса на имунни комплекси и анти-гломерулобазални антитела в съдовата стена [122]. Острият тубуло-интерстициален нефрит е честа причина за ОБУ в контекста на ANCA асоциираните васкулити [96]. От тази група най-честите васкулити водещи до развитие на ОБУ са Грануломатоза на Wegener, Микроскопски полиангиит, Пурпура на Schonlein-Henoch, Синдром на Churg-Strauss както и Системният лупус еритематозус предимно III и IV клас [48]. Грануломатозата на Wegener и Микроскопския полиангиит се извяват най-често с внезапно и остро влошаване на бъбречната функция и бързо прогресиращ ход [144, 271]. Като цяло остро влошаване при тази група заболяване протича с отпадане на около 50% на бъбречната функция [123].

## **Кардиоренален синдром (КРС)**

Определението на КРС, предложено от работната група на The Acute Dialysis Quality Initiative през 2010 г. е: “Сложно патофизиологично заболяване на сърцето и бъбреците, при което остра или хронична дисфункция на единия орган може да предизвика остра или хронична дисфункция на другия орган” [210, 172]. Патофизиологията на КРС е комплексна и многофакторна [101, 82]. Възниква в резултат на сложно взаимодействие между хемодинамични промени (намален сърдечен дебит, бъбречна хипоперфузия, венозна конгестия [173], интраабдоминална хипертония) с неврохормонална активация (дисфункция на симпатиковата нервна система, активиране на РААС) [82, 72]. Влияние оказват и нарушенията в имунната и цитокинова сигнализация, както и на оста хипоталамус-хипофиза [51, 139, 58, 63, 45, 150].

Важни предразполагащи фактори са захарен диабет (ЗД), артериална хипертония, затлъстяване/метаболитен синдром [155, 210]. В около 60% от случаите на възникнал КРС, предразполагащ фактор е придружаващо ХБЗ. Съпътстващи кахексия [210], протеинурия, прием на високи дози диуретици, хипонатриемия, анемия [210], вторична белодробна хипертония, напреднала възраст значимо повишават риска от развитие на КРС [9].

През последните години нараства ролята на йод-съдържащи радио контрастни вещества [120, 186, 230]. Неоптималното дозиране на диуретици [214, 52], RAAS-блокери [238, 197] и антагонисти на алдостерона [199] при лечението на СН може да компрометира бъбречната хемодинамика.

Класификацията на КРС включва 5 подтипа. Критериите, на които се основава са свързани с първичната органна дисфункция на сърцето – кардиоренален синдром или на бъбреците – ренокардиален синдром и дали органната дисфункция е остра или хронична [209].

Сложните патофизиологични механизми определят сериозната непосредствена и далечна прогноза на пациентите с КРС. Нарушаването на обратната връзка и на нормалните контрарегулаторни механизми може да доведе до комбинирана

дисфункция на двата органа. Неблагоприятният изход се свързва с прогресия до полиорганна недостатъчност, медикаментозна резистентност, а при част от болните и до смърт [9].

## **Мултиплен миелом**

ОБУ е често срещано при пациенти с мултиплен миелом (ММ) и повлиява сериозно прогнозата [73]. Тя е по-неблагоприятна при болните, които се нуждаят от хемодиализно лечение. В някои от случаите ОБУ може да бъде и първата клинична изява на ММ [132]. Патофизиологията на ОБУ при ММ често е многофакторна [132]. Основна причина за тежката бъбречна увреда е тубулоинтерстициална патология, резултат от повишена екскреция на моноклонални имуноглобулинови леки вериги. Тези ендогенни протеини могат да причинят изолирана проксимална цитотоксичност, тубулоинтерстициален нефрит и “миеломен “бъбрек [216]. По-рядко високите нива на свободните леки вериги могат да доведат до болест на не-амилоидни моноклонални лековерижни депозити (Light-Chain Deposition Disease- LCDD) [5]. При нарастване концентрацията на свободните леки вериги, те се откриват в тубулната течност и накрая в урината. Свободните леки вериги взаимодействат с проксималните ТК, които активират възпалителна каскада и причиняват тубулоинтерстициална фиброза.

Свободните леки вериги заедно с белтъка на Tamm–Horsfall формират отлагания в дисталния тубул, които блокират гломерулния поток и водят до развитие на тубулна атрофия. Основният механизъм на тубулната увреда е свързан с тубулна обструкция в резултат на преципитация на леки вериги в дисталния нефрон. Процесът води до прогресираща интерстициална фиброза [216]. Рискът от ОБУ при ММ нараства, когато екскрецията на леки вериги е над 2g/24 часа.

## **Остро бъбречно увреждане на трансплантиран бъбрек**

Исхемията е неминуемо събитие, съпътстващо бъбречната трансплантация [129].

Бъбречната исхемично-реперфузионна увреда е мултифакторен процес, водещ до органно увреждане и бъбречна дисфункция [42, 229]. Засяга не само ранната, но и по-късната функция на трансплантирания бъбрек, както и преживяемостта на пациента [129]. Предизвиква се от множество фактори: свободни кислородни радикали, нарушение в концентрацията на вътреклетъчния калций, активиране на мононуклеарни клетки, ендотелна клетъчна увреда, капилярна обструкция. През този период възникват биохимични и възпалителни тъканни събития, водещи до дисфункция на графта [43]. Увредата, медирана от свободните радикали, предизвиква освобождаване на проинфламаторни цитокини и активира имунната система. Крайният етап на исхемичната увреда възниква по време на реперфузията, развиваща се часове или дни след първоначалното увреждане [26].

Нови данни разкриват участието на Т-клетките и адхезионни молекули, свързани с левкоцитите в патофизиологията на исхемичната бъбречна увреда, както при трансплантиран, така и при нативен бъбрек [32, 50].

Исхемично-реперфузионното увреждане причинява тубулна увреда. В ранната фаза тубулната обструкция води до ниско филтрационно налягане. По-късно намалената натриевата реабсорбция предизвиква аферентна вазоконстрикция и по механизма на гломерулно-тубулната обратна връзка-понижаване на филтрационното налягане в гломерула. Най-често се наблюдава дегенерация и екслоиация на тубулни епителни клетки, интерстициален оток и интерстициална клетъчна инфилтрация [14].

## РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА РАЗВИТИЕ НА ОБУ

Рискът от развитие на ОБУ се увеличава под въздействие на редица фактори или наличие на съпътстващи състояния и заболявания. Факторите, които определят чувствителността на бъбреците към увреждане включват дехидратация, определени демографски характеристики и генетични предразположения, остри и хронични съпътстващи заболявания и лечение.

Рискът от развитие на ОБУ зависи от взаимодействието между податливостта на бъбрека към увреждане, вида и продължителността на въздействието. Това е валидно най-вече за хоспитализирани пациенти, където податливостта на болния може да се оцени преди предстоящи оперативни интервенции или приложение на потенциално нефротоксични агенти. Тези данни позволяват някои модифицируеми фактори да бъдат коригирани и адаптирани, което намалява риска от ОБУ.

Рискът от ОБУ, придобито в обществото, е различен от възникване на ОБУ в болнични условия, поради две основни причини: 1) наличните данни за рискови фактори, в голяма степен са извлечени от болничната информация и не могат да се екстраполират в обществената среда; 2) възможността да се прекрати излагането на въздействието е доста ограничена. Препоръчва се пациентите да бъдат стратифицирани по риск от развитие на ОБУ според техните съпътстващите рискови фактори и вредни въздействия [95, 204, 255, 234].

Много автори единодушно посочват, че **напредналата възраст** над 75 г. и **женският пол** се свързват с по-висок риск от развитие на ОБУ [95, 204, 255, 234].

Налице са литературни данни за по-висока честота сред **афро-американци** [95, 204, 255, 234].

Клинични студии, оценяващи над 1000 тежко болни с ОБУ лекувани в сектора за интензивни грижи, установяват **генетичен полиморфизъм** на BCL2; SIK3; SERPINA4; SERPINA5 при синдрома на ОБУ. В тези студии се доказва, че пациенти с GC хаплотип имат нисък риск от развитие на ОБУ, въз основа на BCL2 [83, 118, 146].

**Злокачествените заболявания** могат да предизвикат ОБУ чрез инвазия бъбрека, оказване на компресия, наслагване на инфекция или усложнение с Tumor lysis syndrome (TLS). Синдромът причинява ОБУ в резултат преципитация на кристали от пикочна киселина и калциев фосфат, които обострят дехидратацията и ацидозата. Тези две метаболитни състояния се развиват поради това, че TLS не е подозиран и не са проведени поддържащи грижи. Превенцията на ОБУ налага внимание при пациенти с първично висок риск от развитие на TLS и мониториране на първичните му прояви [104].

**ХБЗ** се свързва с повишен риск от развитие на ОБУ, най-вече при болни с ХБЗ 3-5 ст. (GF <60 ml/min.1,73 m<sup>2</sup>) [81].

И двата типа **ЗД** се асоциират с по-висок риск от развитие на ОБУ, особено след провеждане на кардиопулмонален байпас. Рискът е сигнификантно по-висок при ЗД тип 1 [100]. Литературните данни сочат, че рискът от ОБУ е по-голям при чернокожи със ЗД, спрямо диабетици от кавказката раса [153, 76].

**Артериална съдова болест, хронични белодробни и чернодробни заболявания** създават повишена предиспозиция към ОБУ [95, 204, 255, 234].

**Миотоксични фактори**, предразполагащи към ОБУ, са алкохол и забранени субстанции, липидопонижаващи средства, анестезия и по-рядко вирусни инфекции. Тежката рабдомиолиза може да е причина за ОБУ в 7-10% от всички случаи в САЩ [12, 270].

По-висока е честотата на ОБУ при **дехидратация, хипотония, анемия, термична травма** [95, 204, 255, 234, 81].

**Големите оперативни намеси** (напр. кардио-пулмонален байпас) повишават риска от развитие на ОБУ в резултат на възможни промени в хемодинамиката, кръвно-газовата обмяна и възникване на системни възпалителни реакции-Systemic inflammatory response Syndrome (SIRS) [235].

Значителна е честотата на ОБУ при пациенти развили **abdominal compartment syndrome (ACS)**. С най-голям риск за изявата му са болни със септичен шок, тежък панкреатит, хепаторенален и кардиоренален синром [166]. Причините за изявата на ACS са



развитие на абдоминална хипертония или повишено венозно налягане и венозен застой в бъбреците [65, 140, 142, 257]. Предразполагащи фактори са ексцесивни вливания на течности, механична вентилация с високо интраторакално налягане и ацидоза. Олигурията и бъбречната дисфункция са сред най-ранните признаци на ACS [149]. Нерядко се наблюдава неблагоприятен клиничен изход.

Пациентите в интензивните отделения получавали **вливания с hydroxyethyl starch (HES)-хидроксиетил скорбяла** показват сигнификантно по-висок риск от развитие на ОБУ [90]. При тях се повишава възможността да се стигне до бъбречна заместителна терапия, инфузия на еритроцитна маса и изява на сериозни усложнения, в сравнение с болните получавали кристалоиди и/или албуминови разтвори [177].

## ЧЕСТОТА НА ОБУ

В клиничната практика ОБУ има висока честота. Налице е световна тенденция за нарастване на честотата ѝ, свързана с удължената продължителност на живот, съпътстващи заболявания, въздействие на токсични нокси и увеличен брой хоспитализации за септични състояния [12, 136].

В спешните отделения честотата е 5-20% и се наблюдава предимно при пациенти с полиорганна недостатъчност [159,160]. Tsagalis G обобщава данните от шестнадесет месечно мултицентрово проспективно проучване, в което са включени 29000 пациенти, постъпили в интензивния сектор. ОБУ се установява при около 6% от изследваните. Водещи причини са били сепсис или кардиогенен шок. Около 5% от болните с ОБУ са провеждали бъбречно-заместителна терапия [245].

Малко са проведените проучвания, изследващи ОБУ в извънболнична среда. Под 1% от хоспитализираните в САЩ са с ОБУ, придобита в обществото.

В САЩ над 1 милион души годишно са диагностицирани с ОБУ. Делът на засегнатите пациенти нараства, въпреки непрекъснатото подобряване на болничната грижа- данни на Nickolas et al. от 2012 г.

ICNARC (Intensive Care National Adult Research Centre) сочи, че в отделенията за интензивни грижи при 1/10 пациенти се диагностицира ОБУ. Британският NCEPOD (National Confidential Enquiry into Patient Outcome and Death) заключава, че се подценяват детайлите свързани с ОБУ, което води до забавяне на пациента в диагностично отношение [15].

В глобален мащаб от ОБУ са засегнати 5–7% от всички хоспитализирани пациенти. Много висока е честотата след сърдечна хирургия при възрастни и деца-30-40% [130].

По данни на диализните структури в България, лекуваните с хемодиализа (ХД) болни с ОБН доскоро бяха от 61 до 78 пациенти годишно на 1 милион население. През последните години броят им нараства. През 2013 г. регистрираните случаи на ОБН са се увеличили на 107 пациенти годишно на 1 милион. През 2014г. в България 1291 пациенти с ОБУ са провеждали бъбречно заместително лечение. Общо са осъществени 8634 диализни процедури, средно по 7 процедури на пациент. Починали са 420 болни, т.е. смъртността е 33%. През 2015г. пациентите с ОБУ на диализно лечение са 1284. Смъртността е намаляла на 27,5%.

ОБУ/ОБН може да се изяви във всяка възраст. При пациенти над 65 год. възраст честотата е 45%. Смъртността е висока и корелира с коморбидността, усложненията на основното заболяване и броя на другите поразени органи [10]. На таблици 3 е представена смъртността от ОБУ в страната от 1960 до 2004г. Таблица 4 отразява болничната смъртност от ОБУ според RIFLE критериите.

Таблица 3. Смъртност от ОБУ в България за периода 1960-2004г.

Период	Смъртност
1960-1970	54%
1975-1980	71%
2001-2004	80%

Таблица 4. Болнична смъртност от ОБУ според RIFLE критериите

Степен на ОБУ (RIFLE)	Болнична смъртност
Първа степен R (risk)	9%
Втора степен I (injury)	11%
Трета степен F (failure)	26%

Липсата на чувствителни и специфични биомаркери за ранно откриване на ОБУ силно затруднява диагностицирането и лечението на тези пациенти и има неблагоприятен ефект върху терапевтичното поведение и клиничния изход от ОБУ [62]. Забавянето в диагностицирането на ОБУ, базирано на промяната в нивото на Scr, се явява сериозен проблем [39].

Като се имат предвид ограниченията на Scr, търсенето на по-надеждни биомаркери за ОБУ е от особена важност за съвременната медицина.

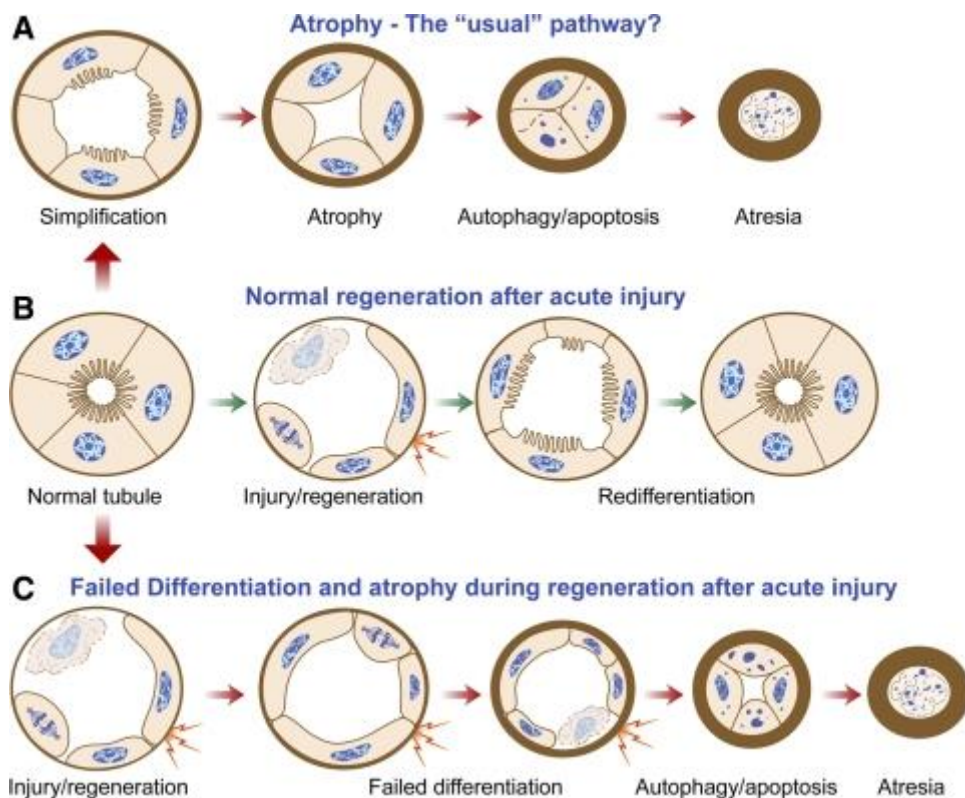
## **ПАТОФИЗИОЛОГИЯ НА ИЗОСТРЕНО ХРОНИЧНО БЪБРЕЧНО ЗАБОЛЯВАНЕ**

Предшестващото ХБЗ е сред най-честите предиктори за развитие на ОБУ. ХБЗ се дефинира като изчислена ГФ  $\leq 60$  мл/мин  $1.73 \text{ m}^2$ . След настъпване на лекостепенна увреда бъбрекът има способността да възстанови своята структурна и функционална цялост. При по-тежко увреждане и при съпътстващи бъбречни отклонения, възстановителният процес може да доведе до фиброза, която улеснява прогресията към ХБЗ. Няколко големи епидемиологични проучвания, проведени върху кохорти от хоспитализирани болни разкриват, че пациенти, преживели епизод на ОБУ, имат значимо повишен риск от развитие на краен стадий на бъбречно заболяване [107, 115, 61].

Последни данни предефинират ролята на оцелелите епителните клетки като участници във фибротичния процес. Те допринасят за експанзията на миофибробласти и трансформирането им в периваскуларни и интерстициални фибробласти. След тежко увреждане проксималните ТК отговарят с нарушен пролиферативен отговор. Той променя клетъчния цикъл, който спира в G2/M фаза. Този процес води до образуването на профибротични фактори като цитокини, растежни фактори и матриксни протеини.

На базата на нови данни Humphreys et al. допускат, че патологията, която се развива в регенериращите тубули след настъпването на

ОБУ протича с дефектна диференциация. Процесът се съпътства от трайно повишено ниво на сигнална активност, която генерира промени в интерстициума: възпаление, редукция на капилярната мрежа и фибробластна пролиферация [112, 111]. На фигура 2 схематично е изобразен процесът на тубулна регенерация след ОБУ.



Фигура 2. Тубулна регенерация след ОБУ.

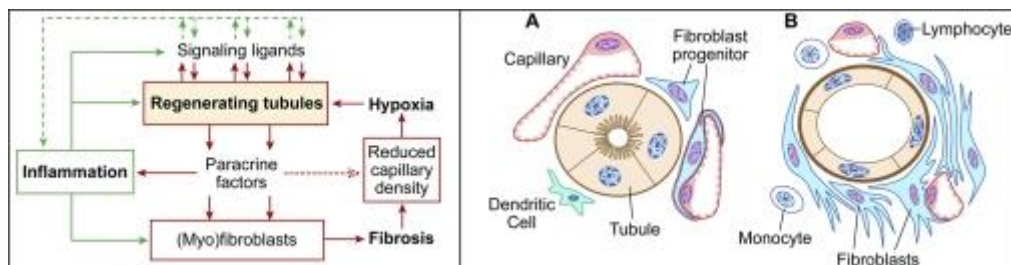
Възможно е да не настъпи диференциране на каналчетата, а и тубулите да проявят профибротична паракринна активност преди да атрофират.

(A): обичайният, нормален път на тубулна атрофия, който се обективизира от морфологичните изследвания върху увредени бъбреци. Той включва разреждане на епителните клетки, напредваща автофагия и апоптоза, придружена от значително съгъстяване на тубулните базални мембрани. В края на процеса тубулите стават атретични и са обвити от плътна мембрана или изчезват напълно.

(Б): нормална регенерация на тубулите след ОБУ с настъпване на смърт на епитела, включващ начална дедиференциация, миграция и пролиферация на оцелелите клетки. Този процес се последва от редиференциация и пълно възстановяване на нормалната структура. За разлика от обичайния (А) път, тубулните клетки, оцелели след ОБУ достигат до атрофия по друг механизъм (В).

(В): след дедиференциацията, миграцията и пролиферацията те не успяват да се редиференцират. След неопределен период от време, през който тубулите са в състояние на т.н. "недиференциация", техните базални мембрани продължават да задебеляват, като същевременно претърпяват атрофия чрез автофагия и апоптоза, както при обичайния път, с изчезване на атрезията.

Повишената епителна паракринна сигнализация, протичаща в пролифериращите клетки по време на регенерация, спира ако тубулите се редиференцират нормално (Б). Сигнализацията може да персистира в каналчета, при които не се е осъществила редиференциация по фенотип (В) за неопределен период, преди да започне атрофията. Тази паракринна сигнализация води до възпаление и фиброза, представено на фигура 3.



Фигура 3. Паракринна сигнализация в бъбречните тубули

*Вляво:* Хипотетична схема, представяща връзката между сигналната активност в регенериращите тубулни клетки и последващите сигнални събития в интерстициума: възпаление, фибробластна пролиферация и капилярна рефрактерност.

Въпреки, че епителната сигнализация и произтичащата от нея паракринна активност е пусков механизъм, последващото взаимодействие между възпалението, фибробластите, капилярния ендотел и тубулния епител засилват този "порочен кръг". Последва

отделяне на ранни сигнали, които определят по-нататъшните събития.

*Вдясно:* патофизиология на тубулоинтерстициалната фиброза. Действието на сложната интерактивна сигнална мрежа води до трансформиране на нормалния (А) тубулоинтерстициум в тубулоинтерстициална фиброза: недиференцирани/атрофични тубули, пролиферация на прогениторни фибробласти, намаляване на капилярната плътност и възпаление (Б).

На базата на тези данни Venkatachalam et al разработват подробна хипотеза за патофизиологичната роля на ОБУ за прогресията на ХБЗ към краен стадий на бъбречна увреда [253].

Пациентите с изострено ХБЗ по време на хоспитализация имат сигнификантно по-лоша преживяемост в сравнение с пациентите с ОБУ без предшестващо ХБЗ. Болните с изострено ХБЗ, при които не настъпва подобряване на бъбречната функция, при дехоспитализацията имат по-лоша прогноза по отношение на смъртност и дългосрочно ХД лечение.

Продължителният ефект на изостреното предшестващо ХБЗ в критични условия е слабо проучен, въпреки че рискът от смърт, кардиоваскуларни събития и честота на хоспитализация нарастват значимо при пациентите с  $\text{ГФ} \leq 60$  мл/мин  $1.73 \text{ м}^2$ . При болните с изострено ХБЗ се наблюдава по-висока честота на невъзстановена изходна бъбречна функция спрямо пациентите с ОБУ. Изостреното ХБЗ в по-голяма степен води до краен стадий на бъбречно заболяване спрямо самостоятелната прогресия на хроничната бъбречна увреда.

До сега няма проучване, което да сравни честотата на смъртност и нуждата от продължително ХД лечение между пациенти с изострено ХБЗ и тези с ОБУ.

Vin-Cent Wu et al публикуват интересни резултати от мултицентрово проучване, проведено в Тайван. Включени са 9425 пациенти, хоспитализирани по повод предстоящо оперативно лечение. Преди хоспитализацията 3.7% от болните са имали предхождащо ХБЗ, а

2.0%-са в краен стадий на бъбречно заболяване. След хирургичната интервенция, в края на болничния престой, 46.6% са имали епизод на ОБУ по време на хоспитализацията. Само 2.5% от тази група са развили изострено ХБЗ.

Възстановяването на бъбречната функция е с по-висока честота при болните с ОБУ без предхождащо ХБЗ, спрямо тези, които са имали изострено ХБЗ (86.7% vs. 72.3%;  $p < 0.01$ ) [268]. Честотата на пациентите провеждали ХД лечение до дехоспитализацията е по-ниска в групата с ОБУ, отколкото при тези с предшестващо ХБЗ (1.0% vs 25.6%;  $p < 0.01$ ). Не малък брой проучвания представят резултати, от които се стига до заключение, че пациентите с предшестващо ХБЗ е по-вероятно да останат на трайно ХД лечение след епизод на ОБУ, наложил инициране на бъбречно заместителна терапия по време на болничния престой [103, 201].

Hsu CY et al, при изследване на кохорта от 1746 пациента, както и Ishani A et al при проследяване на 233 803 болни потвърждават, че подлежащото ХБЗ марканто увеличава риска от развитие на ОБУ.

Рискът нараства пропорционално на стадия на ХБЗ. Резултатите показват, че болните с изострено ХБЗ имат по-ниска преживяемост отколкото тези с ОБУ през целия четиригодишен период на проследяване след оперативната намеса [108, 115]. Факторите, повишаващи риска от летален изход при изострено ХБЗ, са напреднала възраст, мъжки пол, трахеостомия, СН, коронарна болест на сърцето.

В обсъждането на резултатите от проучването, Vin-Cent Wu et al коментират, че пациентите с ХБЗ без възстановяване на бъбречната функция след епизод на ОБУ имат по-висок риск от смъртност и персистирание на риск от продължителна диализа, в сравнение с пациентите с ОБУ при които бъбречната функция също не се е възстановила [268].

## **ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИДЕАЛНИТЕ БИОМАРКЕРИ ЗА ОБУ**

През последното десетилетие по-доброто разбиране на ранния патофизиологичен отговор на бъбрека към редица стресови етиологични фактори доведе до регистриране на множество гени и протеини, които бързо се индуцират в бъбрека. Те участват в регулацията на важни механизми, модулиращи бъбречната увреда. Някои от тези бъбречни протеини, установени и изследвани в серум и урина, отговарят на специфичните нужди за диагностиката на ОБУ и нейния клиничен ход [254, 244, 203, 99, 250, 168 ].

**Идеалните биологични маркери за диагностициране на ОБУ** трябва да са:

- (1) достъпни, бързи за изпълнение, акуратни, валидирани, рентабилни, най-вече надеждни, позволяващи многократно използване на голям брой проби
- (2) да откриват мястото на първичното увреждане (проксимален тубул, дистален тубул, интерстициум, съдова мрежа)
- (3) да са високо органо-специфични, да разграничават случаите на паренхимно, преренално или постренално ОБУ, както и наличието на остра гломерулна увреда.
- (4) да определят продължителността на бъбречната недостатъчност (ОБУ, ХБЗ или “остро върху хронично “бъбречно увреждане)
- (5) да диференцират ОБУ от други форми на остро бъбречно заболяване (инфекции на пикочните пътища, ГН или интерстициален нефрит)
- (6) да разграничават етиологията на ОБУ (хипоксия, токсини, сепсис или комбинация от тези фактори);
- (7) в прогностично отношение да подпомагат стратифицирането на риска (продължителност и тежест на ОБУ, необходимостта от бъбречно-заместителна терапия, продължителност на болничния престой и смъртност)



- (8) да прогнозира хода на ОБУ
- (9) да мониторира отговора спрямо провежданото лечение
- (10) изследването не трябва да бъде инвазивно. Да се използват лесно достъпни материали като кръв и урина;
- (11) да са лесни и бързи за определяне при леглото на болния или в стандартна клинична лаборатория;
- (12) да са приложими спрямо различни популации (пол, раса и възраст).

Биомаркерите с доказана биологична роля в хода на ОБУ в максимална степен биха отговорили на желаните диагностични и прогностични характеристики.

Недостатък е, че плазмените нивата на биомаркерите могат да бъдат повлияни от субклинични промени в бъбречната екскреция или екстраренални фактори. Други недостатъци са невъзможността да се вземе урина от пациенти с тежка олигурия, както и промени в концентрацията на биомаркерите в резултат на хидратационния статус и диуретичната терапия.

### **Биомаркери за ОБУ, определяни в серума.**

Азотните вещества в кръвта, уреята и Scr, се изследват рутинно за диагностициране ранните стадии на ОБУ. В клиничната практика ОБУ се регистрира, когато концентрацията на Scr нарастне за кратък период от време, с или без развитието на олигурия. Отчитането на маркери за ОБУ в серум може да бъде особено полезно при пациенти с тежка олигурия, както и наличието на потенциални промени в концентрацията на уринните биомаркери, индуцирана от състоянието на хидратация и диуретична терапия [219, 254, 67].

## Серумен креатинин

Креатининът е ендегенен продукт с молекулно тегло 113 Da с относително постоянна продукция в мускулите и постоянна плазмена концентрация. Той е краен продукт от разграждането на фосфокреатина в мускулите и се продуцира от биологична система, включваща креатин, фосфокреатин и АТР [77, 196]. Креатининът се отстранява от кръвта главно чрез бъбреците—първично чрез ГФ, но също и чрез проксимална тубулна секреция [77, 227]. Претърпява незначителна или никаква реабсорбция [196]. Scr е важен индикатор за бъбречната функция, тъй като е лесно измерим продукт на мускулния метаболизъм и се екскретира непроменен от бъбреците. Нивата на Scr се използват за изчисляване на ГФ [224]. Нивото на ГФ има важно клинично значение за оценка на бъбречната функция, но при тежка ренална дисфункция креатининовият клирънс (GFR) свръхоценява ГФ, поради хиперсекреция на креатинин от проксималните тубули, което води до фалшиво повишени резултати [1, 2, 196, 243, 31]. Проксималната тубулна секреция се увеличава неколкостранно при влошаване на бъбречната функция и така GFR е по-висок от действителната ГФ.

Нормалните стойности на ГФ представени като клирънс на ендегенния креатинин са 80-180 ml/min или средно 120 ml/min. Levey 2005 определя инулиновия клирънс за златен стандарт като метод за изчисляване на Glomerular filtration rate (GFR), но процедурата по измерването е инвазивна и тромава. Това го прави неподходящ за ежедневно прилагане [141].

Редица екстраренални фактори влияят върху продукцията на креатинина: възраст, пол, мускулна маса, белтъчен прием, промени във водно-електролитния баланс, прием на някои медикаменти—НСПВС, Циклоспорин, антихипертензивни средства [77]. Циметидин намалява тубулната секреция на креатинина и прецизира изчислената ГФ, особено при тежка бъбречна дисфункция [3]. Въпреки широкото използване на Scr в клиничната практика, са налице редица ограничения в приложението му при определяне на ГФ.

Приложението на NGAL, разкрива нови възможности за търсене на иновативен подход за оценка на бъбречната функция при ОБУ.

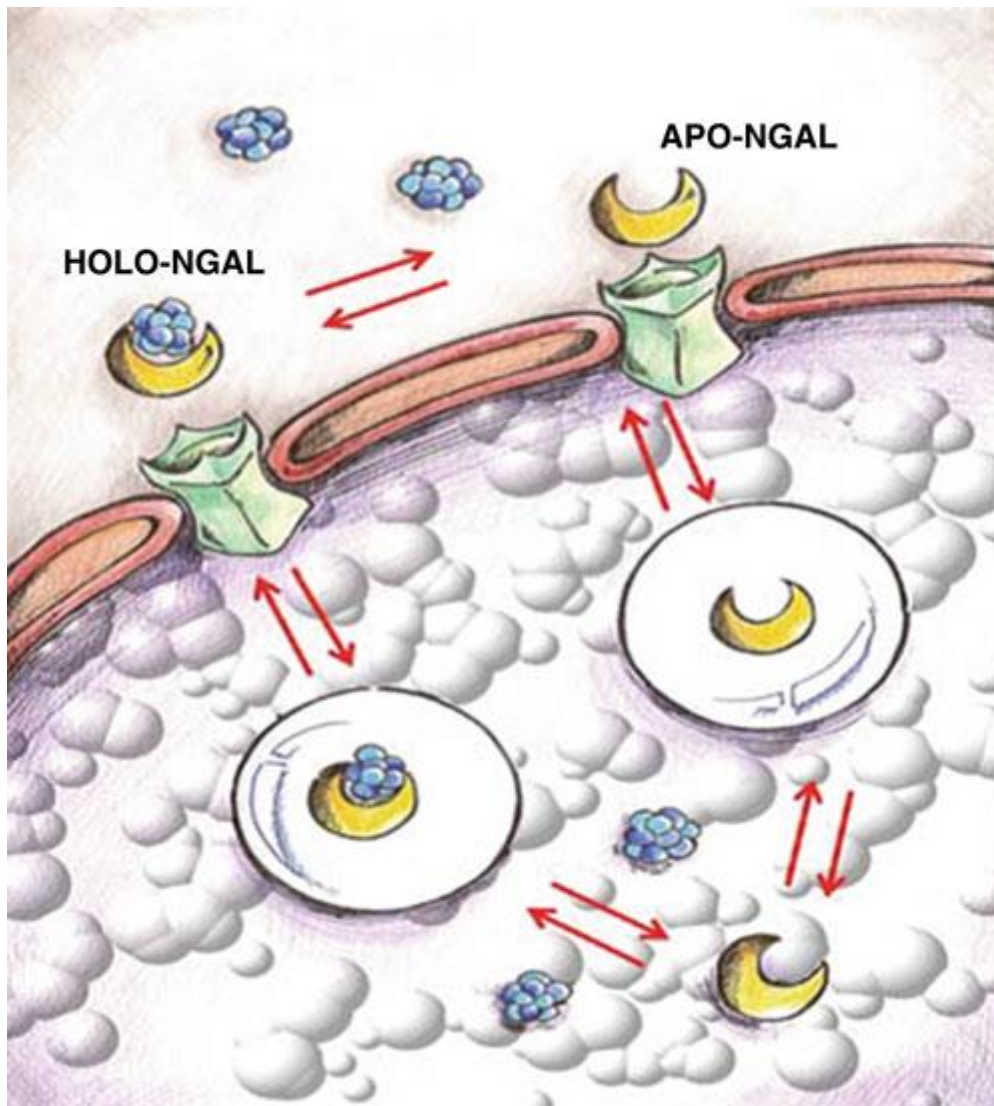
NGAL се проявява като безупречен биомаркер в серума и урината както в диагностично, така и в прогностично отношение. Потенциални възможности за оценка на ОБУ се откриват и чрез определянето на KIM-1, IL-18 и NAG.

### **Неутрофилен гелатиназа асоцииран липокалин (NGAL)**

NGAL представлява 25-kDa липокалин, изолиран първично от човешки неутрофили и е детерминиран в серума. Отнася се към семейството на белтъци с ниско молекулно тегло (липокалини), ангажирани с трансмембрания транспорт на липофилни съединения. Синтезира се в ранния миелоцитен стадий на гранулоцитопоезата, по време на формирането на вторичните гранули. NGAL mRNA се експресира в повечето тъкани и органи (костен мозък, слюнчени жлези, бял дроб, черен дроб, стомашно чревен тракт), включително и в бъбреците. Някои от тези тъкани са изложени често на влиянието на микроорганизми и експресират ниски нива на NGAL протеини. Промоторният участък на NGAL гена притежава свързващи места за значителен брой транскрипционни фактори, включително nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B). Това би могло да обясни както нормалната, така и индуцираната експресия на NGAL в някои тъкани, които не са свързани с хемопоезата. NGAL има бъчвообразна терциерна структура с хидрофобна опашка, свързваща малки хидрофобни молекули. Основните лиганди за NGAL са сидерофорите. NGAL съдържа компонент на вродения имунитет срещу бактериална инфекция, за което свидетелстват експериментални доказателства от генетично модифицирани мишки без ген за NGAL. Отсъствието му ги прави предразположени към Грам-отрицателни инфекции и смърт вследствие на сепсис.

Сидерофорите, участват в NGAL-медиираният транспорт на желязо, което е решаващо по отношение на различни клетъчни отговори като пролиферация и диференциация (Фигура 4). По време на формиране на бъбреците NGAL подпомага епителното диференциране на мезенхимните прогенеторни клетки, което води до създаването на гломерули, проксимални тубули, бримка на

Хенле и дистални тубули. Въпреки това се наблюдава подчертана експресия на NGAL в увредените епителни клетки както в бъбрека, така и в органите на храносмилателния тракт, черния дроб и белите дробове. Това вероятно е медирано от NF- $\kappa$ B, за който се знае, че се активира бързо в епителните клетки след остра увреда и има важна роля в контролирането на клетъчното съхраняване и пролиферация. При увреждане на бъбрека, биологичната роля на NGAL се изразява в запазване на функцията, забавяне на апоптозата, както и усилен пролиферативен отговор. Този защитен ефект зависи от хелацията на токсичното екзогенно желязо и регулирания пренос на сидерофори и желязо към интрацелуларното пространство [106]. Проучванията на генната експресия при ОБУ показват бързо и мощно повишаване на NGAL- mRNA в дисталните сегменти на нефрона, предимно 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 на уринния NGAL.



Фигура 4. Молекулярни механизми на действие на NGAL на клетъчно ниво. NGAL може да бъде поет от клетките самостоятелно като (Аpo-NGAL) или като комплекс с желязо-свързващ сидерофор (Holo-NGAL). Картината е изготвена от Bolignano and Vuemi 2009; with permission from Publisher Nuova Editoriale Bios.

Въпреки, че плазменият NGAL свободно се филтрира през гломерула, той в голяма степен се реабсорбира в проксималния тубул. Оттук следва, че експерията на NGAL вероятно се дължи на бъбречна увреда със засягане реабсорбцията в проксималния тубул и/или индуциране синтеза *de novo* на NGAL в дисталния тубул. По отношение на плазмения NGAL, бъбрекът не е основният източник. В кръвообращението протеинът произхожда и от други органи като

черен дроб, белите дробове, както и от активирани клетки на имунния отговор. Освен това, всяко понижаване степента на ГФ намалява експресията на NGAL с последващо повишаване в серума при пациенти с ХБЗ. Проучванията при хора определят NGAL като отличен биологичен маркер за ранно диагностициране, терапевтично мониториране и прогноза при ОБУ. Разработването на стандартизирани клинични платформи за бързото и прецизно определяне на NGAL в серум и урина, допълнително улеснява широкото приложение на NGAL като биомаркер. Той се счита за високо специфичен, чувствителен, надежден и с висока прогностична стойност ранен биологичен маркер от ново поколение за ОБУ.

В ранните стадии на ОБУ, предизвикано от фактори с различна етиология, NGAL акумулира в две ясно отграничени депа - системен и бъбречен басейн. Допълнително участие на този параметър в акумулацията на системният басейн при ОБУ може да бъде от неутрофили, макрофаги и други клетки на имунната система. Освен намаляване на ГФ като резултат от възникването на ОБУ, се очаква намаляване и на клирънса на NGAL с по-нататъшна акумулация в системния басейн. Серумна концентрация на NGAL по-висока от 25 µg/l е сигурен предиктор за развитие на ОБУ при деца [67, 206, 266]. При възрастни хора, повишената експресия на NGAL е най-значима и явна на 2-я час след сърдечна операция, докато повишената концентрация на NGAL в урината предшества покачването на Scr. При възрастни с ОБУ, се наблюдава 10-тократно повишаване на концентрацията на NGAL в кръвта, така както и 100-кратно нарастване на уринните нива. Концентрацията на NGAL в серум и урина е в тясна връзка със серумната концентрация на креатинина. Тези наблюдения позволяват изготвянето на хипотеза, според която NGAL в урина представлява чувствителен, високо предсказващ, ранен маркер за отграничаване на остра преренална бъбречна недостатъчност от ОБУ или ХБЗ.

### **Предимства на NGAL**

При проучване сред пациенти с установено ОБУ с различна етиология се открива съществено повишение на NGAL в плазмата и урината в сравнение със здрави контроли. Нивата на серумния и

уринен NGAL корелират с тези на Scr, а при хистологичен препарат от бъбречна тъкан се разкрива интензивно натрупване на имунореактивен NGAL като чувствителен показател за диагностициране на ОБУ при хора. Най-добре е проучено нивото и промяната на NGAL при пациенти, при които ОБУ е очаквано усложнение. Определянето на серумната концентрация на NGAL предсказва развитието на ОБУ след кардиопулмонален байпас или аплицирането на радиоконтрастни агенти. Освен това той представлява високо чувствителен, но неспецифичен предиктор за развитието на ОБУ при деца със септичен шок [67,206,266].

Резултатите от проведените до момента проучвания сочат, че NGAL е нов предиктивен биомаркер за ОБУ и се счита че е готов за рутинна клинична употреба [207]. При ХБЗ повишените му нива в плазма и урина корелират с тежестта на бъбречното увреждане. NGAL се оказва най-чувствителен и специфичен показател при хомогенни пациентски популации с предсказуеми форми на ОБУ. Скорошен мета-анализ на завършили проучвания при пациенти след сърдечна операция разкрива цялостната ROC AUC=0,76 за предсказване на ОБУ, когато NGAL се измерва до шестия час след кардиопулмонален байпас (ОБУ се дефинира като повишаване на креатинина с >50%). Тази предсказваща стойност е сходна с прогнозирането на остър миокарден инфаркт (ОМИ) от тропонина. [78] Уринният NGAL е ранен биомаркер за определяне степента на увреда при IgA нефропатия и предстоящ рецидив на лупусен нефрит до 3 месеца преди неговото активиране. Може да се повиши и при уроинфекции [21].

### **Недостатъци на NGAL**

Съпътстващо ХБЗ, артериална хипертония, възпалителни заболявания, анемия, злокачествени заболявания могат да повлияят определянето на плазмения NGAL. При възрастни NGAL има по-малка предиктивна стойност отколкото при деца.

При хетерогенна популация от пациенти в сектора за интензивни грижи уринният NGAL има умерена предиктивна стойност за ОБУ (ROC AUC=0,71).

В обобщение-NGAL е ценен биомаркер в ранните часове след ОБУ, прогнозиращ развитието на ОБУ при хетерогенна група пациенти с множествен коморбидитет и с неизвестна давност на бъбречното засягане.

## **Цистатин С (CysC)**

CysC, намиращ се в серума, представлява ендогенен маркер за бъбречна функция и се регистрира значително по-рано от повишаване нивото на Scr. И двата маркера подпомагат диагностиката оценка на бъбречна дисфункция и установяват прогресията на ОБУ.

Той представлява негелатиназен протеин, ендогенен цистеин-протеазен инхибитор, който се произвежда от всички ядрени клетки и се освобождава в кръвния поток в постоянна концентрация. След въвеждането през 1994 г. на имунотурбидиметрията за определяне на серумния CysC, той е предложен за златен стандарт за оценка на бъбречната функция. Анализът от ROC (AUC=1.000) кривата показва, че серумният CysC има значително по-добра диагностична възпроизводимост от Scr [182, 94]. Понастоящем серумните нива на CysC се измерват чрез имунонефелометър, или ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA).

CysC се счита за по-силен предиктор в сравнение с креатинина по отношение честотата на хоспитализации в кардиологични отделения, риска от смърт от сърдечно-съдови инциденти както при възрастни пациенти, болни с периферна артериална болест, исхемична болест на сърцето, ХБЗ и в общата популация.

Vokenkamp A et al провеждат проучване включващо 258 деца, на средна възраст 6.29 г. (възрастов интервал от 1 ден до 18 години). Авторите установяват, че при деца над 1 година, възрастта не оказва значително влияние върху серумното ниво на CysC за разлика от това на креатинина [33]. Grubb A и съавтори при проучване обхващащо 85 деца на възраст от 3 месеца до 18 години стигат до заключението, че CysC е по-подходящ маркер за



изчисляване на ГФ в детската популация [86]. Няколко проучвания разкриват, че CysC е по-добър маркер за оценка на ГФ при диабетици сравнено с креатинина [176, 200].

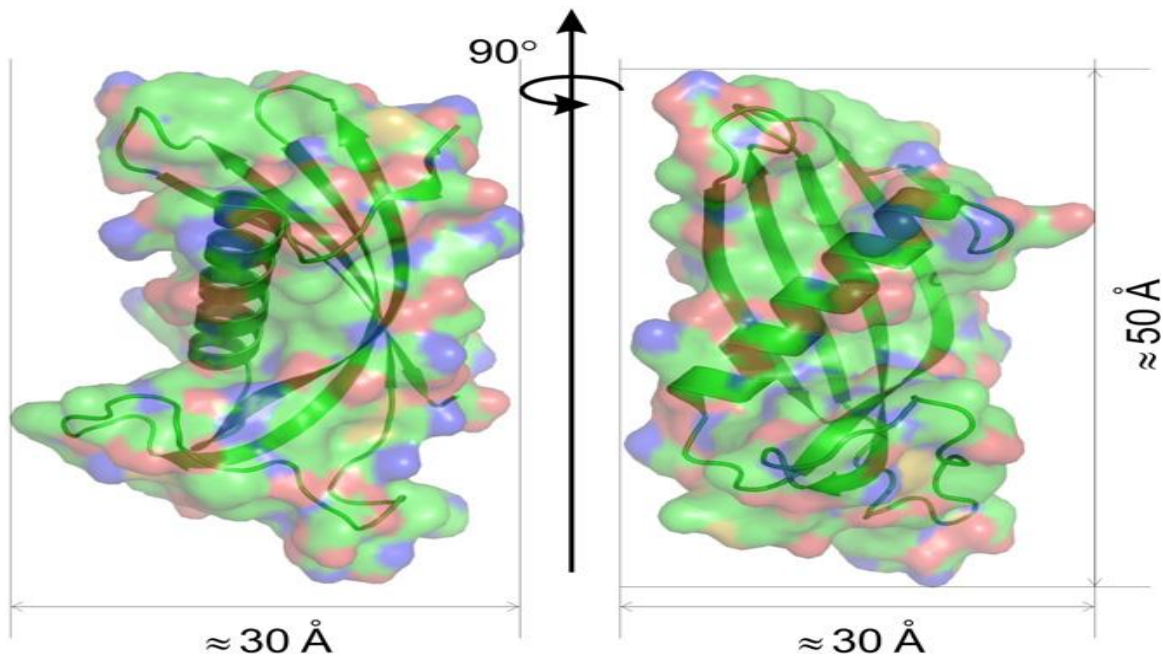
Два мета-анализа на Dharnidharka VR 2007 и Roos JF 2007, сравняващи CysC и креатинина като маркери за ГФ достигат до подобни заключения и приемат, че CysC е по-добър маркер за доказване на намаляване на ГФ в интервала 79-60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> [70, 211]. Тъй като самостоятелното приложение на креатинина като маркер за гломерулна филтрация има редица недостатъци, се приема, че формулите за изчисляване на ГФ трябва да бъдат модифицирани.

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) препоръчва две формули за изчисляване на ГФ- Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) и Study Group and the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD epi) с участието на CysC, като по този начин се избягва влиянието на мускулната маса.

Релативно високата концентрация в телесните течности, ниското молекулно тегло (13.3 кДа) и положителния заряд на неговата молекула подпомагат свободната му ГФ в първичната урина. CysC се абсорбира и катаболизира през проксималните тубули, но без да се секретира от тях. Той се измерва в урината като следи. За периода 2000-2007 г. са проведени 6 проучвания, които оценяват серумните нива на CysC при пациенти с установена ОБУ. Тези неголеми студии включват общо 181 болни. Соса и съавт. съобщават, че чувствителността на маркера е между 0.87 и 0.97, а специфичността-между 0.85 и 1.0. Неговите серумни нива могат да бъдат използвани за регистриране на бъбречна дисфункция при тежко болни пациенти с ОБУ в първите 24-48 часа [60, 244].

При нарушена тубулна функция, концентрацията на CysC в урината може да нарастне до 200 пъти над нормата. Повишената концентрация на CysC в урината при пациенти с ОБУ, е белег за неблагоприятно развитие на заболяването и налага започването на бъбречна заместителна терапия от по-ранна фаза, преди развитие на олигурия, за да се осигури възможност за превенция прогресията на заболяването. Съотношението CysC в урина/креатинин в урина представлява достатъчен индикатор за регистриране на бъбречно-тубулна дисфункция. CysC се отличава с висока стабилност при

съхраняване в рутинни условия [254, 244, 212 ]. Схематично изобразяване на CysC на фигура 5.



Фигура 5. Схема на спираловидната структура на CysC.

В левия панел молекулата е сгъната като пет-верижен антипаралелен бета-лист, обхващащ дълга алфа спирала. В перпендикулярна ориентация (десен панел), алфа-спиралата е преминала през вдлъбнатата повърхност на бета-листа. Молекулата има вид подобен на плоча с най-дълъг размер между папаин-свързващия епитоп и недобре структурирания краен сегмент. Размерите са изчислени за всички неводородни атоми, включително и страничните вериги. Последните се визуализират като молекулна повърхност и са оцветени по различен начин в зависимост от вида на атомите около основната верига. Атомният модел изключва N-терминален пептид, който обикновено е нарушен и не може да се проследи с карти за електронна плътност. (фигурата е изготвена от PyMOL).

## ПРЕДИМСТВА НА CysC

Концентрацията на CysC не зависи от фактори като възраст, пол, раса, телесно тегло, хидратационен статус на организма. Тъй като не се влияе от циркадния ритъм, CysC може да се определи в единична проба урина. Във връзка с постоянното ниво на неговото

образуване, оценката на концентрацията на серумния CysC като маркер за ГФ, не се повлиява от инфекция, чернодробно заболяване или възпалителен процес. CysC е по-скоро ранен маркер за увредена гломерулна функция, отколкото тубулна дисфункция [254, 244, 60, 212 ].

## **НЕДОСТАТЪЦИ НА CysC**

Серумните нива на CysC могат да бъдат повлияни при хипертиреоидизъм [121, 125] и от употребата на умерени и високи дози кортикостероиди [16].

В обобщение-CysC е обещаващ маркер за оценка на ГФ при ОБУ.

## **Уринни биомаркери за ранна бъбречна увреда**

Уринният анализ е универсален неинвазивен метод за диагностика, характеризиращ протичането и предсказващ клиничния изход при много от бъбречните заболявания. Наскоро бе оценена ефективността на нови лабораторни маркери, намиращи се в урина, за диагностика на ОБУ [249]. Някои от тези маркери са добре известни, тъй като се изследват рутинно, докато други тепърва се проучват. В медицинската литература са публикувани анализи, чиято цел е откриване на маркери специфични за ранна бъбречна увреда. Най-скоро проучените маркери са гени, които се индуцират рано след настъпването на исхемия, предизвикана в експериментални условия в клетъчни култури от животни. Развитието на молекулярната биологична техника, като протеомния уринен анализ, представлява надежден инструмент за търсене и намиране на дискретни промени в генни топици, които имат директна връзка с патогенезата и погресията на ОБУ [183, 203, 41].

Маркерите за ОБУ, предложени в научната литература могат да бъдат класифицирани в три групи:

- (1) Ензими, освободени от некротизирали или апоптозни, увредени или нарушени ТК, екскретирани с урината- алкална фосфатаза, гама-глутамил транспептидаза, аланин-аминопептидаза, N-

ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаза, богат на цистеин протеин 61 (CYR61);

(2) Ниско-молекулни протеини (<40 кДа), които се откриват в урината са показател за тяхната нарушена реабсорбция от първичната урина в проксималните ТК; Определянето на протеините с ниска молекулна маса става чрез използване на ELISA метода- CysC, ретинол свързващ протеин,  $\alpha_1$  и  $\beta_2$  – микроглобулин [99].

(3) Маркери, специфично продуцирани от бъбрека по време на ОБУ. Те биват три категории:

- генетично обусловени протеинови продукти, свързани с ОБУ-NGAL, молекула за бъбречна увреда-1 (KIM-1);
- хемокини и цитокини-IL-18, IL-6, IL-8, Gro  $\alpha$  [208, 210];
- Структурни и функционални белтъци от бъбречните тубули-F-actin, NHE3 [221, 41, 244, 246].

Биомаркерите за ОБУ, търсени в урина трябва да отговарят на следните характеристики:

(1) да притежават диагностична специфичност за откриване на лезии в бъбречните тубули;

(2) да регистрират остра бъбречна увреда (преди покачване на Scr и урея);

(3) уринната им концентрация да корелира с тежестта на бъбречното заболяване;

(4) да имат предиктивна стойност по отношение на развитие на очаквани неблагоприятни клинични резултати;

(5) да улеснява вземането на терапевтични решения.

## **Уринни ензими от бъбречен произход**

Значимата полза по отношение диагностичната стойност на тези ензими идва от факта, че те се продуцират от отделни, точно определени части на вътреклетъчните структури, като цитоплазма, лизозоми или клетъчни мембрани. Тяхното оценяване може да даде прецизна информация за произхода, големината и мястото на увредата на ТК и настъпването на вероятна некроза или дисфункция [244, 265, 99, 46].

### **N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаза (NAG)**

Изследването на NAG в урината като маркер за бъбречна увреда, заслужава специално внимание. NAG е лизозомен ензим и е най-активната глюкозидаза в лизозомите на проксималните тубулни епителни клетки (Фигура 6). Секретира се в малки количества като резултат от естествения процес на екзоцитоза [202, 134]. NAG представлява специфичен уринен маркер за ТК. Филтрацията му през гломерулите е невъзможна поради високото молекулно тегло (>130 кДа). Високата уринна екскреция на NAG зависи от повишеното му освобождаване от ТК. Този процес не се влияе от повишената филтрация при увреждане на капилярната стена [56]. В периода 2003-2006 год. при 201 пациенти е извършена оценка на тежестта на ОБУ чрез две скор системи. Причини за ОБУ са били сепсис, исхемия, атероемболия, нефротоксини, полиорганна недостатъчност, гломерулонефрит и други фактори. При тези немалък брой пациенти се установява, че уринните нива на NAG остават трайно завишени. [143]

Екскрецията на този ензим с урината е високо чувствителен маркер за нарушение на бъбречните тубули и изглежда има директна връзка с нарастване стойностите на Scr и намаляване на ГФ. Ензимурията се явява рано и е много по-чувствителен диагностичен маркер отколкото тубулната протеинурия.

Hultberg B et al правят проучване, включващо 109 пациенти с гломерулонефрит, при които уринната концентрация на NAG е висока [110, 194, 134]. При пациенти с гломерулонефрит тубулната атрофия корелира с уринната концентрация на NAG. Важността на

ензима се демонстрира при гломерулни заболявания с протеинурия. Повишената му екскреция се установява дори при липса на морфологични белези за тубулна увреда. Възможно обяснение на този факт, е че лизозомалната активност в ТК нараства, когато филтрацията на белтък е повишена [134]. Описаният механизъм може да илюстрира корелацията между високата концентрация на NAG и протеинурията [27]. През 2002 г. Vazzi С и съавтори са изследвали 67 пациенти с нефрозен синдром. Повишените нивата на NAG са имали по-добра предиктивна стойност по отношение прогресията на гломерулната болест към ХБН, спрямо степента на протеинурията [27]. John M. Arthur et al описват повишаване на уринните нива на NAG при пациенти с IgA нефропатия и с тубулоинтерстициална увреда [21]. Dillon SC и съавтори през 1998 год. са изследвали 16 пациенти на средна възраст 12 г с болест на минималните изменения и 183 контроли на възраст между 2 и 16 г. Те съобщават, че уринните нива на NAG могат да се използват за отчитане постигането на ремисия или рецидив на болестта на минималните изменения при деца. За сравнение пациентите в ремисия са с нормални нива на NAG в урината [71].

Значително нарастване стойностите на NAG се наблюдава още от първия ден на бъбречната увреда. Нивата му намаляват едва в късната фаза на болестта, независимо от продължителността на увредата или въздействието [21].

Наблюдава се връзка между активността на NAG и отложената функция на графта, резултат на тубулна увреда, възникнала на базата на исхемично-реперфузионно увреждане [49]. Установява се силно положителна корелация между високата уринна активност на NAG и степента на тубулна атрофия при биопсичен материал от бъбречен алографт на 3-ти и 12-ти месец след трансплантацията. Наблюдава се сигнификантна отрицателна корелация между уринната активност на NAG с ГФ на 14-тия ден, 3-тия месец, 1-та, 2-та, 3-та и 5-тата година след трансплантация [134]. Не се наблюдава взаимовръзка между активността на NAG и остро отхвърляне на бъбречния алографт при ПББ [134].

Установено е, че екскрецията на NAG нараства след прилагането на кадмий, контрастни агенти, аминокликозиди и други нефротоксични агенти [215, 202, 195].



Фигура 6. Схематично изображение на NAG. Фигурата е отпечатана в ръководство за работа с китове DIAZYME на производителя Roshe за ELISA - Hitachi.

### **ПРЕДИМСТВА НА NAG**

NAG е високо чувствителен за диагностицирането на ОБУ. С лоша прогноза на заболяването и по-ранно прилагане на бъбречно заместителна терапия се свързва високата активност на NAG в урината, персистираща за дълъг период. Не е установена повлияване на NAG-активността от приложението на имunosупресивни агенти [134].

Doi and co (2012) намират повишаване на уринните нива на NAG при пациенти с преренална ОБУ, лекувани в сектора за интензивни грижи [75]. Уринният NAG е подходящ маркер за предвиждане развитие на ОБУ при новородени доносени деца с хипербилирубинемия [56].

## **НЕДОСТАТЪЦИ НА NAG**

Повишената активност на NAG в урината говори за увреда на тубулните клетки, въпреки че може да отразява повишена лизозомална активност, без наличие на клетъчна увреда, каквато има при туморни процеси в разпад [244, 143].

В обобщение-множество са доказателствата, че NAG е най-добър прогностичен маркер за бъбречна функция при ОБУ спрямо останалите ензими от проксимално тубулен произход [99].

## **Нискомолекулни протеини в урина, като маркери за остро бъбречно увреждане**

### **Специфични уринни маркери за ОБУ**

Специфичните биологични маркери, присъстващи в урината могат да бъдат обобщени в три категории:

(1) Специфични протеинови деривати, генно-свързани с ОБУ

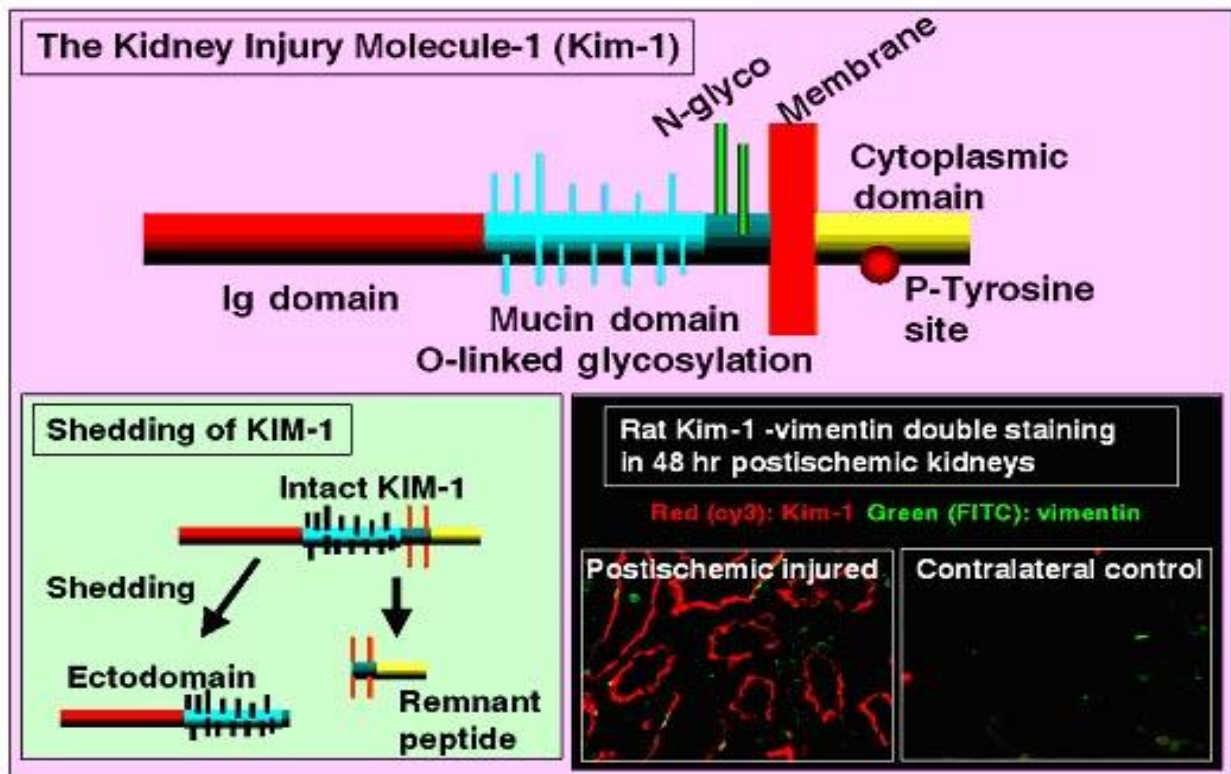
Експериментални проучвания, извършени с култури от клетки на човешки проксимални тубули, както и при животни, доказват гени, които се индуцират рано и многократно повишават концентрацията си при настъпване на исхемия. Протеиновите деривати на тези гени, включително и KIM-1, могат да послужат като нови маркери за оценката на ОБУ [254, 165, 163, 174, 91].

### **Молекула за бъбречна увреда-1 (KIM-1)**

KIM-1 е регистриран през 2002 г. като белтък от тубулен произход. Han WK и съавт. го клонират от плъхове, мишки и хора, претърпели исхемична увреда [91]. Той не се открива при здрави индивиди. При експериментални условия, използващи молекулярни биологични техники, KIM-1 се регистрира при хора и животни, показвайки белези на маркер за исхемия и остра тубулна увреда, вследствие на токсини [174, 91, 80]. KIM-1 представлява тип 1 трансмембранен



протеин с екстрацелуларен имуноглобулин и високо О-гликозилиран муцинов субдомейн (Фигура 7).



Фигура 7. Схематично изображение на KIM-1.

Ектодомейнът съдържа два домейна: Ig-домейн и муцинов домейн [114]. Муциновият домейн е силно гликозилиран с О-свързани захаридни вериги.

Долната лява фигура представя премахване на KIM-1 ектодомейна. KIM-1 ектодомейнът се разцепва и се свързва с металопротеиназа [25]. Остатъчният пептид може да се открие като продукт на отцепването.

Долната дясна фигура илюстрира двойно имунофлуоресцентно оцветяване на KIM-1 и виментин при плъх, съответно в червен и зелен цвят. По-долу е представена фигура на бъбрек от плъх 48 часа след исхемия. Замразените срези са анализирани с R9 анти-плъх KIM-1 поликлонално антитяло.

Тази структура предполага, че KIM-1 има адхезивна роля. KIM-1 е първият регистриран немилониден фосфатидилсеринов рецептор, трансформиращ епителните клетки във фагоцити. Така KIM-1 се явява рецептор за мъртва материя [15, 25, 113]. Извънклетъчния

ектодомейн на KIM-1, прикрепен към металопротеиназите и екскретиран в урината е количествен маркер за ОБУ. Повишената експресия и усилена синтеза на KIM-1 възниква в зони на тубулоинтерстициални лезии с възпаление и фиброза. Индукцията на KIM-1 нараства при остро настъпила лезия и при значима протеинурия. KIM-1 се открива рано в хода на тубулна увреда при ПББ и в урина. Високите му нива предшестват появата на цилиндрурия. При хора и в животински модели се наблюдава поне 5-кратно нарастване нивата на KIM-1 в урината още на първия ден след увредата на бъбречните тубули от токсична нокса, докато покачването на азотните тела се наблюдава едва на третия ден [250, 91].

Съществено нарастване на екскрецията на KIM-1 с урината, се отчита едва няколко часа след сърдечна манипулация, водеща до исхемия. Повишената екскреция на KIM-1 с урина е характерна за исхемична бъбречна увреда и практически е независима от ХБЗ или инфекции на пикочните пътища [252]. Високата концентрация на KIM-1 в урината предшества по-неблагоприятен резултат при пациенти с ОБУ [254, 244, 203, 250, 91, 242, 274].

## **ПРЕДИМСТВА НА KIM-1**

KIM-1 е обещаващ, сензитивен и специфичен маркер за ОБУ при хора, на практика оставащ непроменен от физичните и химичните качества на урината и нейните компоненти в сравнение с креатинина. Food and Drug Administration (FDA) и European Medicines Evaluation Agency (EMA) включват KIM-1 в списък с показатели за бъбречно увреждане, които се прилагат за оценката на бъбречното засягане в процеса на разработване на нови лекарствени средства [79]. Liangos et al 2007 съобщават, че при пациенти с установена ОБУ, високите нива на KIM-1 имат прогностично значение, подобно на NAG, по отношение на неблагоприятния клиничен изход, свързан с нуждата от бъбречно заместително лечение и смъртност [143].

Han WK et al 2008 са изследвали уринните нива на KIM-1 при 44 деца с кардиопулмонален байпас, развили ОБУ 1-3 дни след интервенцията. Концентрациите на KIM-1 се повишават значително в рамките на първите 12 часа след операцията [93]. Подобни

резултати са получили Krawczeski CD и съавтори 2011, които са изследвали уринните нива на KIM-1 при 220 деца развили ОБУ 1-3 дни след кардиопулмонален байпас. [130, 92].

Van Timmeren MM и колектив изследват uKIM-1 при 145 трансплантирани пациенти. От проведеното мултицентрово проспективно проучване между 2001 и 2003 г. KIM-1 се представя като независим предиктивен маркер за хронична загуба на графта при реципиенти с бъбречен трансплантат, независим от бъбречната функция и протеинурия [15, 251]. Повишената уринна екскреция на KIM-1 практически не зависи от хроничните бъбречни заболявания или уринарна инфекция.

## **НЕДОСТАТЪЦИ НА KIM-1**

Поради възможността да взаимодейства с други протеини, KIM-1 може активно да моделира процесите на увреждане или възстановяване.

## **Цитокини и хемокини в серум и урина**

Прогностичната роля на цитокините при изследването им в серум и урина е недостатъчно проучена в различните стадии на бъбречната болест, както и тяхната роля на предиктори на фатален изход при тежко болни пациенти. Gro- $\alpha$ , IL-6 и IL-18 са цитокините, смятани за най-подходящи при диагностицирането на ОБУ [203,168, 41].

## **Интерлевкин-18 (IL-18)**

IL-18, известен още като Interferon- $\gamma$  – индуциращ фактор е мощен проинфламаторен цитокин, медиатор на възпалението и исхемичната тъканна увреда в много органи, включително и в бъбрека (ТК, подоцити и мезангиални клетки). IL-18 е представен схематично на фигура 8.

Експериментални проучвания при животни с индуцирана остра исхемична тубулна некроза разкриват, че каспаза-1 медирана активация на вътреклетъчния IL-18 е отговорна за бъбречното увреждане по време на протичането на ОБУ, независимо от ролята на неутрофилите. Източник на каспаза-1 и IL-18 при ОБУ са исхемичните клетки на проксималния тубул [254, 244, 78, 157, 98, 97, 158, 260, 269].

Не е известно дали IL-18 се произвежда от неутрофилни левкоцити или паренхимни клетки от бъбрека по време на исхемична увреда и дали тя допринася за бъбречната травма. Механизмите, по които IL-18 предизвиква бъбречно увреждане по типа на исхемия-реперфузия, включват генерирането на ефекторни молекули като индуцирана азотен окис синтаза и TNF $\alpha$ , както и хемокини важни за активиране на макрофагите и стимулиране на неутрофилната инфилтрация. Иmunният отговор играе ключова роля в патогенезата на исхемичната бъбречна увреда при ОБУ. Той включва наследствено предразположение за повишена бъбречна продукция на mRNA, също така и свързаните с него проинфламаторни цитокини и хемокини [269].

IL-18 участва във вродения и придобит имуен отговор. Той стартира цитокиновата каскада с едновременна експресия на проинфламаторни маркери [20]. Свърхпроизводството му се регистрира при различни възпалителни и автоимунни заболявания.

Calvani et al. съобщават, че при експериментален миши модел и при човешки лупусен нефрит IV и V клас експресията на IL-18 от гломерулите се повишава [178]. Hewins et al. установяват, че при ANCA – асоцииран системен васкулит, собствените бъбречни клетки (подоцити, интерстициални миофибробласти, инфилтриращи интерстициални макрофаги и дисталните тубулни епителни клетки) продуцират IL-18 [185].

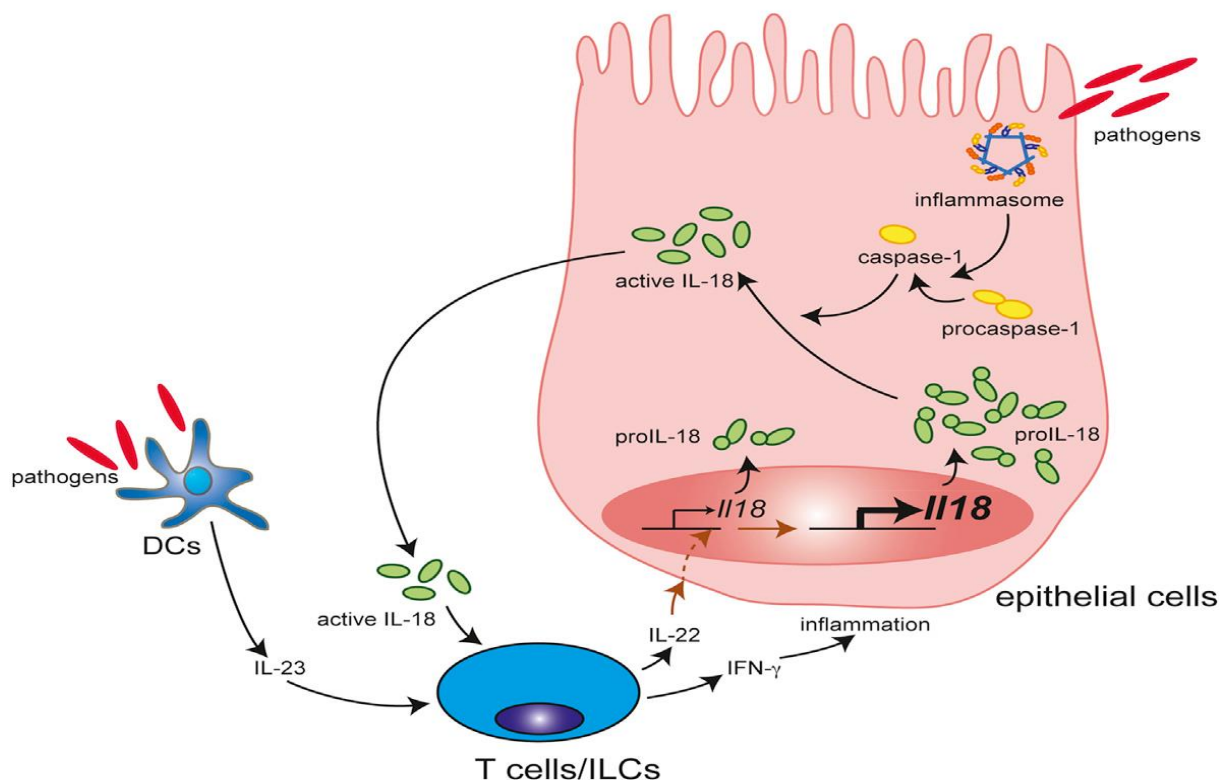
През 2011 г. Veili Shi и колектив публикуват статия, илюстрираща връзката между повишените нива на IL-18 и влошаването на бъбречната функция при пациенти с IgA гломерулонефрит. Той може да бъде маркер за прогресия на бъбречната болест при пациенти с диагностициран IgA гломерулонефрит или исхемично остро бъбречно увреждане [225, 157].

В експериментални модели е описано участието на IL-18 в регулацията на остро отхвърляне на бъбречния алографт. Счита се, че отговорни за този процес са активираните в графта макрофаги.

Може да действа като неутрофилен атрактант и има важна роля в патофизиологията на сепсиса.

Серумният IL-18 има прогностична роля по отношение бъдещото развитие на микроалбуминурия при нормоалбуминурични пациенти със ЗД-2. Въпреки, че механизмите за повишените серумни нива на IL-18 при ЗД-2 не са напълно изяснени, се счита, че участие има оксидативният стрес. Серумното му ниво е сигнификантно повишено при пациенти с горно-гранични нива на албуминова уринна екскреция [180]. Подозира се, че IL-18 може по-рано да отразява изостряне на хроничното възпаление в сравнение с C-reactive protein (CRP) или може специфично да отрази локално бъбречно възпаление [181].

Публикуват се резултати за наднормени нива на IL-18 при мозъчно съдова болест. Zaremba J и съавтори изследват IL-18 при 23-ма пациенти с инсулт. Установяват се по-високи нива на маркера при тези болни. Интересен факт е, че нивата на IL-18 са още по-високи при болни с nelaкунарен мозъчен инсулт [273]. Потърсена е взаимовръзка между дебелината интима – медия на каротидната артерия (intima-media thickness-IMT) и сеумното ниво на IL-18. Изненадващо е намерен по-голям IMT при пациенти с високи серумни стойности на IL-18 [188, 22].



Фигура 8. Схематчно представяне на IL-18. (Фигурата е изготвена от Melba Munõ oz, Celine Eidschenk, Markus Heimesaat, Wenjun Ouyang)

## ПРЕДИМСТВА НА IL-18

Регистрирано е, че високите нива на IL-18 са свързани с ускорено понижаване на годишното ниво на ГФ. Наблюдават се значими корелации на серумните му нива с пол, HDL-холестерол, CRP и микроалбминурия[217,30].

## НЕДОСТАТЪЦИ НА IL-18

Lapteva N et al установяват, че серумните нива на IL-18 могат да бъдат повлияни от прием на инхибитори на ангиотензин-

конвертиращия ензим [138, 74]. Високите серумни нива на IL-18 корелират и с други болестни състояния като автоимунни заболявания и циркулаторни нарушения [131].

IL-18 участва в увреждащия процес и при други органи като миокард, бял дроб, гастроинтестинален тракт, макрофагиалната система. Няколко автоимунни заболявания като лупус, ревматоиден артрит, ЗД-1, болест на Crohn, псориазис и реакция на присадката срещу реципиента, се асоциират с висока продукция на IL-18 [74].

В обобщение- определянето на IL-18 в серума е лесен, надежден, точен и рентабилен тест за засичане на бъбречна увреда, предизвикана от исхемия или нефротоксини, което позволява изключване на преренална азотемия, ХБЗ, нефрозен синдром или уринарни инфекции. Това го прави ценен маркер за оценка тежестта на ОБУ. IL-18 в урина има над 90% чувствителност и специфичност по отношение диагностицирането на ОБУ при хора в отделенията по интензивни грижи [254, 67, 189, 261].

Parikh CR през 2005 при изследване на uIL-18 при критично болни и Washburn KK през 2008 при определяне на uIL-18 при деца в интензивните отделения намират, че уринно ниво на IL-18 над 100 pg/ml е свързано с по-висок риск от развитие на ОБУ през първите 24ч. от хоспитализацията [189, 261]. Нарастване на серумните нива на IL-18 се асоциират с по-лоша прогноза по отношение на бъбречната преживяемост.

## **ОБОБЩЕНИЕ**

В заключение ОБУ е сериозен проблем в клиничната медицина, свързан с висока честота и смъртност. Въпреки интензивните изследвания, все още не е открит единственият идеален биомаркер за ОБУ. До сега диагнозата на ОБУ се базира основно на високите нива на Scr, който е недостатъчно специфичен и чувствителен. Протеините, намиращи се в серум и урина описани по-горе могат да се окажат полезни кандидати за диагностицирането на ОБУ, предвиждане прогресията ѝ, както и избора на подходящо терапевтично поведение. По настоящем съществува мнение, че

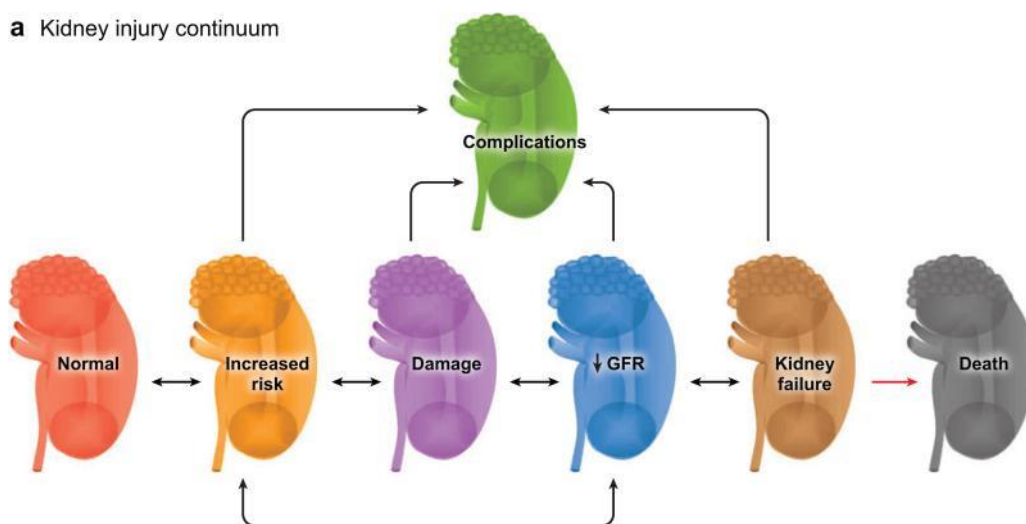
само един маркер не може да идентифицира увредата според бъбречното засягане, както и да определи неговата тежест и да предвиди клиничното протичане. По-популярен е подходът свързан с предлагането на панел от протеинови маркери за оценка на бъбречнотубулната дисфункция, както и идентифицирането на засегнатите сегменти на нефрона (Фигура 9). Тези протеини показват различия в зависимост от техния произход, бъбречна експресия и уринна концентрация. Освен това те се различават по своята чувствителност и специфичност, както и техника на изследване, цена [244, 203, 99, 250, 163, 174]. Най-обещаващите панели от биомаркери определяни в серум и урина могат да бъдат представени по следният начин [143, 67, 135, 69].

- За диференциране и диагностициране на ОБУ:
  - повишаване концентрацията на CysC в серум, нарастване концентрацията на IL-18, KIM-1 и CysC в урина;
  - нарастване стойностите на CysC в серум и на IL-18, NGAL и GST-π в урина.
- За оценка тежестта на ОБУ:
  - високи нива на NGAL и KIM-1 в урина.
- За предвиждане смъртността при ОБУ:
  - повишаване концентрацията на KIM-1, IL-18 и NAG в урината.

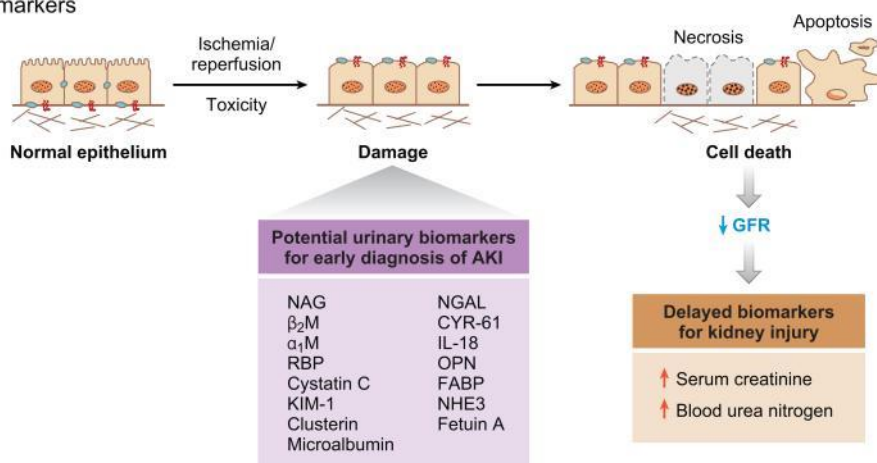
С напредването на технологиите нараства и броят на потенциалните бъбречни биомаркери в серума и урината при пациенти с бъбречни заболявания. Много от тях все още чакат клинично изпитване и потвърждение. Става ясно, че тези бъбречни биомаркери се групират в различни категории, които отразяват различните типове бъбречна увреда.



**a** Kidney injury continuum



**b** Biomarkers



Фигура 9. Биомаркери за ОБУ: Традиционните маркери за ОБУ като урея и Scr са ниско чувствителни, неспецифични и не могат акуратно да отдиференцират различните стадии на ОБУ. Това води до забавяне на диагнозата и терапевтичния избор. Фигурата е изготвена от Vishal S. Vaidya,<sup>1</sup> Michael A. Ferguson,<sup>2</sup> and Joseph V. Bonventre<sup>3</sup>

Прогресът на молекулярния анализ дава възможност за установяване на широк диапазон от потенциални серумни и уринни биомаркери за определяне на бъбречната функция и предсказване развитието на ОБУ и прогресията към ХБЗ. Много от тези БМ могат да се групират според тяхната връзка с определен тип увреждане (подоцитна или тубулна увреда) или механизъм на увреждане (оксидативен стрес, възпаление, фиброза). По-доброто разбиране на връзката между различните категории биологични маркери може

да осигури по-голяма яснота за болестния процес. В допълнение, напредъкът на клиничните изпитвания би довело до създаване на многообразни модели на развитие и проследяване, чиито таргет са различни категории биомаркери. Такива проучвания могат да бъдат полезни за идентифициране естеството на бъбречната увреда или стадия на заболяването. Те могат да бъдат ценни и за изработване на най-подходящият терапевтичен подход за пациентите, за определяне на ефикасността както на нови, така и на утвърдени вече лечебни мероприятия, които имат за цел специфичен болестен процес.

Способността за достоверно определяне на тези биомаркери в серумни и уринни проби зависи от правилното вземане, съхранение и отчитане на пробите, тъй като това може значително да компрометира резултатите. Необходимо е да се установят стриктни протоколи за събирането на пробите, за да се намалят вариациите в откриването на биомаркерите.

Съществуват значими доказателства, че прогресията на бъбречните заболявания може да се предвиди чрез оценяване комбинацията от серумни и уринни биомаркери с други рискови фактори като възраст и артериална хипертония. Все пак ще се изискват мащабни клинични проучвания, сравняващи панели от биомаркери, както и постигане на съгласие по отношение на това коя комбинация предлага най-полезна, резултатна и рентабилна информация.

## **ЦЕЛ**

Да се проучи и оцени диагностичната надеждност на пет нови серумни и уринни биомаркери при остро бъбречно увреждане и изострено хронично бъбречно заболяване с хетерогенна етиология.

## **ЗАДАЧИ:**

1. Да се проучи ролята на биомаркерите sNGAL, sCysC, sIL-18, uKIM-1 и uNAG за диагностициране на ОБУ и изострено хронично бъбречно заболяване (ХБЗ) с хетерогенна етиология и се определи тяхната специфичност и чувствителност.

2. Да се оценят възможностите на БМ за разграничаване на изострено ХБЗ по продължителност и стадиране.

3. Да се потърси корелация между изследваните БМ със SCr и eGFR при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ.

4. Да се потърси корелация между петте БМ, както и тяхната зависимост с други клинични и лабораторни показатели при болните с ОБУ и изострено ХБЗ.

5. Да се изследват различия в нивата на БМ при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ с различни причини за бъбречна увреда.

## **МАТЕРИАЛ**

Обект на проучването: за периода на наблюдението от 2013-2015 г. в Клиника по нефрология УМБАЛ “Александровска” са изследвани 100 болни и 60 доброволци. От общия брой пациенти, преминали през лечебното заведение, 68 болни са с остро бъбречно увреждане, 32-ма - с изострено хронично бъбречно заболяване. Всички лица са български граждани.

Диагностицирането на пациентите с ОБУ се извърши въз основа на събраните данни за манифестно влошаване на клиничното състояние, промените в диурезата и първото изследване на Sc<sub>r</sub>. Разделянето на ОБУ от изострено ХБЗ се направи на базата на анамнеза, образни изследвания и медицинска документация за ХБЗ. Пациентите с ХБЗ са с изчислена ГФ $\leq$ 60 мл/мин 1.73 м<sup>2</sup>.

Групата болни е на средна възраст 59,65 $\pm$ 15,25г. и включва: 1) пациенти с остро влошена бъбречна функция (n=68), на средна възраст 57.16 $\pm$ 15.60г.; 2) пациенти с обострено хронично бъбречно заболяване (n=32), на средна възраст 62.13 $\pm$ 14.90г.

За определяне на диагностичната стойност на CysC, NGAL, IL-18 в серум и KIM-1, NAG в урина при пациенти с различни причини за ОБУ беше взет биологичен материал- серум и прясна урина по стандартизирани критерии

**Предмет на проучването:** възможностите на нови биомаркери спрямо SC<sub>r</sub> и GFR за диагностициране на ОБУ и разграничаването му от обострено ХБЗ.

**Място на проучването:** от 100-те болни 7 пациента са от Клиничен център по нефрология и трансплантация УМБАЛ “Александровска”, 2-ма от Клиника по кардиология УМБАЛ “Александровска” ЕАД, София -Медицински факултет, Медицински университет-гр. София и 1 от Клиника по нефрология УМБАЛ “Каспела” гр. Пловдив.

**Характер на наблюдението:** проучването е проспективно по отношение на включените болни, трансверзално, сравнително. Дизайнът на проучването е срезов с използване на контролна група.

## **Администриране на наблюдението**

Всички участници попълниха информирано съгласие по образец за участие в проучването. Беше предоставена писмена и устна информация относно процедурите, ползите и рисковете, свързани с проекта и достатъчно време да се запознаят с нея. Всички предвидени процедури се извършиха след подписване на информираното съгласие. При пациентите в тежко клинично състояние и невъзможност самостоятелно да се информират и подпишат формуляра, това беше извършено от техен придружител. Наблюдението е проведено от автора на разработката. При провеждане на наблюдението и регистрация на информацията взеха участие лекари и медицински сестри от клиниката. Проучването е администрирано чрез решение на Съвет по медицинска наука с Протокол № 397/2016г. по Договор №60/2014г., Проект №35 с вх. №335/16.01.2014г. Ръководството и контрола по организиране на проучването се осъществяваха от автора със съдействието на научния ръководител.

Изследването включва 160 лица, разпределени в 8 групи, съобразно включващи и изключващи критерии:

**Включващи критерии:** възраст над 18-години; клинични и лабораторни данни за бъбречно заболяване, с остро настъпило влошаване на бъбречната функция; клинични и лабораторни данни за предшестващо ХБЗ с внезапно настъпило остро влошаване; клинични, лабораторни и/или хистологични данни за остър или хроничен тубулоинтерстициален нефрит със съпътстваща есенциална хипертония; клинични, лабораторни и хистологични данни за първични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром или с рецидив, протичащ с влошаване на бъбречната функция; лица с исхемично ОБУ без или с предхождащо ХБЗ; лица с остра или хронична медикаментозна нефропатия.

**Изключващи критерии:** отказ от подписване на информирано съгласие и несъгласие на пациента за провеждане на изследването; лица, с психично заболяване, с умствено изоставане, с деменция;

лица 0-17 години; бременни; лица с алкохолна и/или наркотична зависимост.

Първата група са болни с есенциална АХ и остър тубулоинтерстициален нефрит; пациенти с есенциална АХ и хроничен тубулоинтерстициален нефрит. Съставена е от 35 лица;

Втората група пациенти са 22 лица с първични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром и първични гломерулни болести с рецидив, протичащ с влошаване на бъбречната функция;

Третата група болни, 22 лица с исхемично (в резултат на хиподебитна СН, дехидратация с хиповолемия, периферна вазодилатация) ОБУ без или с предхождащо ХБЗ;

Четвърта група е съставена от 8 пациенти, при които причината за влошена бъбречна функция е системен васкулит на малките съдове с първо бъбречно засягане и системен васкулит в непълна ремисия;

Петата група са 7 лица с остра и хронична медикаментозна нефропатия, причинена от прием на НСПВС, аналгетици, антибиотици, АКЕ-инхибитори, контрастни вещества;

Шестата група е представена от 6 лица с остра миеломна нефропатия;

Седем трансплантирани болни с остра нефропатия на графта, са разпределени съобразно патофизиологичните причини довели до остро влошаване на бъбречната функция: 2-ма пациенти са с остър тубулоинтерстициален нефрит и съпътстваща есенциална хипертония; 5-ма болни са с първични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром на графта.

Като контролна група са изследвани 60 здрави доброволци, на средна възраст  $51,93 \pm 11,46$ . На всички здрави лица са направени лабораторни и образни изследвания. Те нямат съпътстващи заболявания и са със запазена бъбречна функция. Серумният креатинин при жените е  $< 96 \mu\text{mol/l}$ , а eGFR е  $101.13 \pm 17.57$ . При мъжете SCr е  $< 110 \mu\text{mol/l}$ , eGFR-  $101.57 \pm 14.14$ .

## ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТСКИТЕ ГРУПИ

### ✓ Пол

От 100-те изследвани лица-58 (58.0%) са мъже и 42 (42.0%)-жени. С ОБУ са 68 пациенти. От тях 34 (50.0%) са мъже и 34 (50.0%)-жени. От 32-ма пациенти с изострено ХБЗ, мъжете са 24/32, а жените-8/32.

### ✓ По възраст

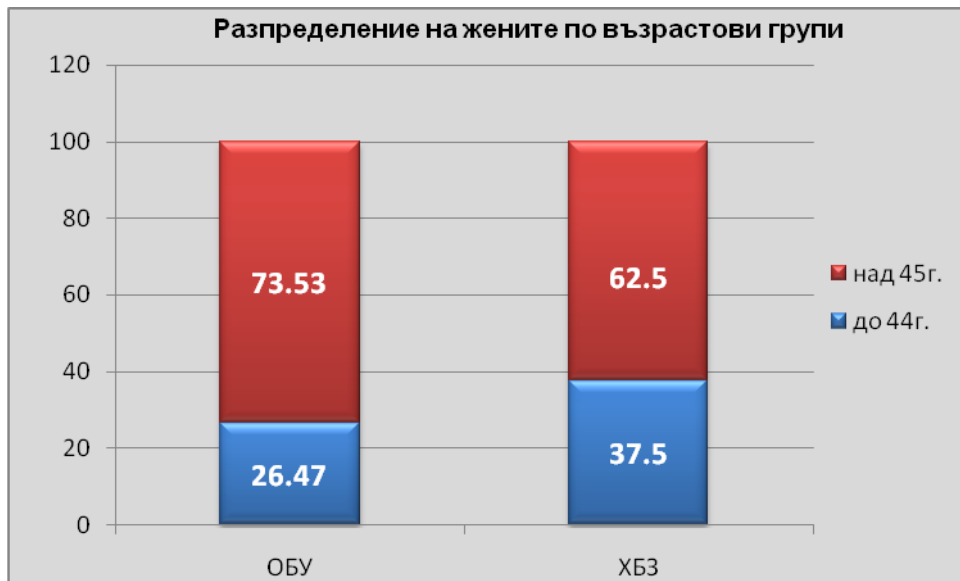
Средната възраст на 100-те пациенти е  $59,65 \pm 15,25$  г. Най-голям е броят на болните в групата над 45 г. (79%). Пациентите до 44 годишна възраст са (21%). При болните с ОБУ средната възраст в групата е  $57,16 \pm 15,60$  г., а при пациентите с изострено ХБЗ-  $62,13 \pm 14,90$  г.

Сравниха се мъжете с ОБУ (n=34) и мъжете с изострено ХБЗ (n=24) по възрастови групи. Седем (20.59%) от болните с ОБУ попадат в групата до 44 години, а 27 пациенти (79.41%) са в старшата група над 45 години. От лицата с изострено ХБЗ 4-ма мъже (16.67%) са в млада възраст, останалите 20 (83.33%) са над 45 години. Не се наблюдават съществени различия във възрастовата структура при мъжете в двете групи (FET=0.71). Разпределението по възрастови групи е представено във фигура 10.



Фигура 10. Разпределение на мъжете с ОБУ и изострено ХБЗ по възрастови групи

Сравниха се жените с ОБУ (n=34) и тези с изострено ХБЗ (n=8) по възрастови групи. Девет (26.47%) от болните с ОБУ са в младата възрастова група до 44 години. В старшата група са 25 жени (73.53%). Младите пациентки с изострено ХБЗ са 3 (37.5%), а тези над 45 години са 5 (62.5%). Не се наблюдават съществени различия във възрастовата структура при жените в двете групи (FET=0.67) Разпределението по възрастови групи е представено във фигура 11.



Фигура 11. Разпределение на жените с ОБУ и изострено ХБЗ по възрастови групи

#### ✓ **Индекс на телесната маса (BMI)**

При 100 изследвани пациенти се определи средна стойност на BMI  $25.85 \pm 4.94 \text{ kg/m}^2$ . Най-ниският BMI е 18, а най-високият 46. В групата с ОБУ изчисленият среден BMI е Me 26.00; IQR  $4.75 \text{ kg/m}^2$ , който съответства на лекостепенно наднормено тегло. Болните с изострено ХБЗ са с BMI  $26.78 \pm 4.94 \text{ kg/m}^2$ , отговорящ на лека към умерена степен на наднормено тегло.

Мъжете с ОБУ имат средна стойност на BMI  $25.26 \pm 3.40 \text{ kg/m}^2$ , а тези с с изострено ХБЗ  $26.83 \pm 5.01 \text{ kg/m}^2$ . Тези различия не достигат статистическа достоверност,  $p=0.29$ .



Жените с ОБУ имат средна стойност на BMI  $25.56 \pm 6.12 \text{ kg/m}^2$ . При пациентките с изострено ХБЗ средният индекс на телесна маса е  $26.63 \pm 5.04 \text{ kg/m}^2$ . Не се отбелязват статистически значими различия,  $p=0.60$ .

### ✓ **Систолно и диастолно артериално налягане**

При постъпването измереното артериално налягане (АН) на фона на редовно провеждана антихипертензивна терапия в цялата група от 100 болни е в референтни стойности за възрастта: систолно артериално налягане (САН)  $126 \pm 19.24 \text{ mmHg}$  и диастолно артериално налягане (ДАН)  $77.90 \pm 11.11 \text{ mmHg}$ . Средните стойности на АН в групата с ОБУ също е в референтни граници: систолно  $122.50 \pm 19.52 \text{ mmHg}$  и диастолно Me  $80.00$ ; IQR  $10.00 \text{ mmHg}$ . При пациентите с изострено ХБЗ се отчитат по-високи стойности на систолното АН, съответстващо на артериална хипертония (АХ) I ст.  $133.44 \pm 16.58 \text{ mmHg}$ . Диастолното АН е в референтни стойности за възрастта  $80.63 \pm 11.05 \text{ mmHg}$ .

При мъжете с ОБУ средната стойност на САН е  $121.91 \pm 20.23 \text{ mmHg}$ , а при тези с изострено ХБЗ  $135.00 \pm 13.51 \text{ mmHg}$ . Тези различия достигат статистическа достоверност,  $p=0.003$ . По отношение на ДАН в групата с ОБУ се намира средна стойност  $76.76 \pm 11.41 \text{ mmHg}$ . При мъжете с изострено ХБЗ се отчита средно ДАН  $81.68 \pm 11.29 \text{ mmHg}$ . Различията в двете групи по отношение на ДАН са на границата на статистическата достоверност,  $p=0.056$ .

При жените с ОБУ средната стойност на САН  $120.00$ ;  $30.00 \text{ mmHg}$ , а при тези с изострено ХБЗ  $125.00$ ;  $25.00 \text{ mmHg}$ . Тези различия не достигат статистическа достоверност. По отношение на ДАН в групата с ОБУ се намира средна стойност  $80.00$ ;  $10.00 \text{ mmHg}$ . При жените с изострено ХБЗ се отчита средно ДАН  $75.00$ ;  $10.00 \text{ mmHg}$ . Различията в двете групи по отношение на ДАН не достигат статистическата достоверност,  $p=0.96$ .

### ✓ По съпътстващи заболявания

При цялата пациентска популация-100 лица, най-висока честота от съпътстващите заболявания има АХ-80.0%, следвана от ЗД-28.0% и ИБС-19.0%. Останалите съпътстващи заболявания се представят с по-ниска честота: хиперурикемия-18.0%; СН-13.0%; предсърдно мъждене (ПМ)-11.0%. Съпътстващите заболявания са представени на таблица 5.

Таблица 5. Съпътстващи заболявания при 100 пациенти

Съпътстващи заболявания	Брой болни	Отн. дял в (%)
<i>Артериална хипертония</i>	80	80
<i>Захарен диабет</i>	28	28
<i>Ишемична болест на сърцето</i>	19	19
<i>Хиперурикемия</i>	18	18
<i>Сърдечна недостатъчност</i>	13	13
<i>Предсърдно мъждене</i>	11	11

При болните с ОБУ с най-висока честота е АХ-72.1%. ЗД имат 26.5% от пациентите. Лицата с ИБС са 13.2%. Със СН и ПМ са по 11.8% и в двете групи. Най-малък е дялът на пациентите с хиперурикемия -8.8%.

От пациентите с изострено ХБЗ с АХ са 96.9%. Еднаква честота на разпределение имат ИБС и ЗД-по 31.3% болни. Със СН са 15.6% от пациентите. Най-малък е дялът на болните с предсърдно мъждене – 9.4%. Пациентите с хиперурикемия са 37.5%.

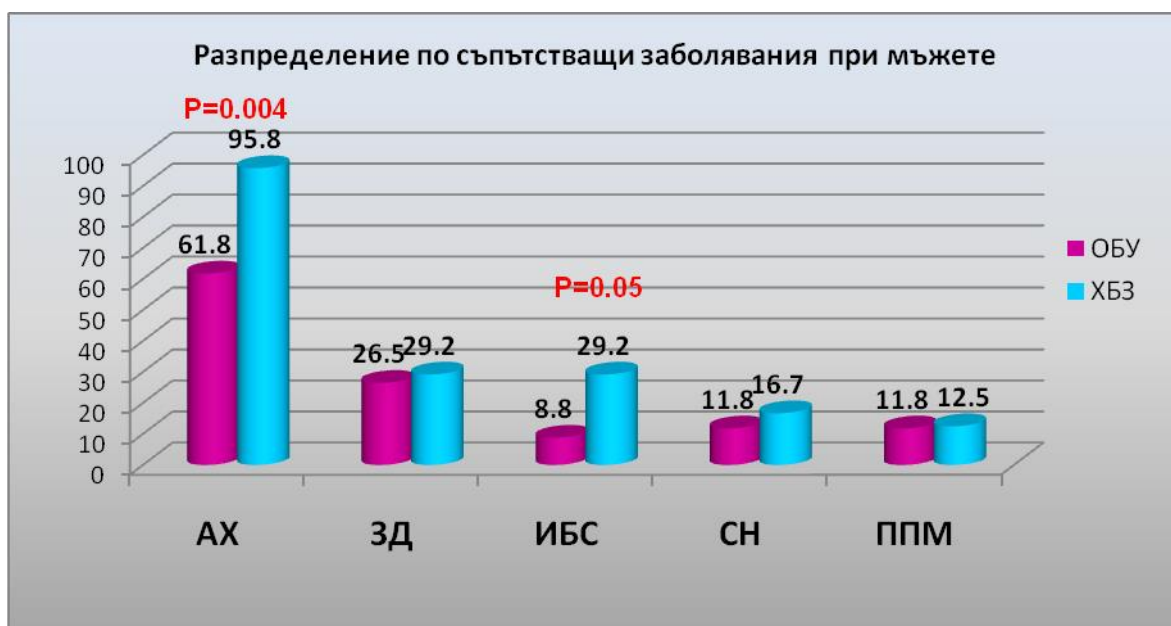
Потърсиха се сигнификантни различия между групите с ОБУ и изострено ХБЗ по отношение на съпътстващите заболявания. Установи се по-висока честота на АХ при болните с изострено ХБЗ-96.9% в сравнение с пациентите с ОБУ-72.1%,  $p=0.002$ . Значимо по-висока е честотата на ИБС-31.3%,  $p= 0.03$  и хиперурикемия-37.5%,

$p=0.015$  в групата с изострено ХБЗ. Сравнението по съпътстващи заболявания е представено във фигура 12.



Фигура 12. Разпределение на болните с ОБУ и изострено ХБЗ по съпътстващи заболявания

При мъжете в двете групи се отчитат сигнификантни разлики по отношение на съпътстващите заболявания АХ и ИБС. Прави впечатление, че те са с по-висока честота при мъжете с изострено ХБЗ. На фигура 13 е представено разпределението по съпътстващи заболявания в двете групи мъже и ниво на значимост.



Фигура 13. Разпределение на мъжете с ОБУ и изострено ХБЗ по съпътстващи заболявания.

Всички жени с изострено ХБЗ са с АХ. По-висока е честотата на ИБС и ЗД в тази група. Не се демонстрират сигнификантни различия по отношение на коморбидните заболявания при двете групи болни. На фигура 14 е представено разпределението по съпътстващи заболявания в двете групи жени.



Фигура 14. Разпределение на жените с ОБУ и изострено ХБЗ по съпътстващи заболявания

### ✓ По групи приемани медикаменти

От 100 пациенти, най-голям е делът на получаващите антихипертензивни средства-78%. На диуретична терапия са 57.0%. Болните на лечение с НСПВС са 49.0%. Останалите медикаментозни групи са представени по честота както следва: антидиабетни средства (перорални/инсулин) -29.0%; кортикостероиди (КС)-28.0%, ксантиноксидазни инхибитори-20.0% и цитостатици-18.0% пациенти. Приеманите медикаменти са представени в таблица 6.

Таблица 6. Дялово разпределение на приеманите медикаменти при 100 пациенти

Групи медикаменти	Брой болни	Отн. дял в (%)
<i>Антихипертензива</i>	78	78
<i>Диуретици</i>	57	57
<i>НСПВС</i>	49	49
<i>Антидиабетни средства</i>	29	29
<i>Кортикостероиди</i>	28	28
<i>Ксантиноксидазни инхибитори</i>	20	22
<i>Цитостатици</i>	18	18

В групата с ОБУ антихипертензивни средства са получавали най-голям брой пациенти-72.1%, следвани от болните на терапия с НСПВС-52.9%. На диуретично лечение са били 51.5% от пациентите. КС са приемали 29.4%, антидиабетно лечение са получавали 27.9% от пациентите в групата. Не е малък делът на болните приемали цитостатици-22.1%. Само 16.2% са лекувани с ксантиноксидазни инхибитори, поради изява на хиперурикемия в резултат на острата увреда на бъбречната функция. На таблица 7е

представен дялът на медикаментите, приемани от пациентите с ОБУ.

Таблица 7. Дялово разпределение на приеманите медикаменти в групата с ОБУ

Групи медикаменти	Брой болни	Отн. дял в (%)
<i>Антихипертензива</i>	49	72.1
<i>НСПВС</i>	36	52.9
<i>Диуретици</i>	35	51.5
<i>Кортикостероиди</i>	20	29.4
<i>Антидиабетни средства</i>	19	27.9
<i>Цитостатици</i>	15	22.1
<i>Ксантиноксидазни инхибитори</i>	11	16.2

Очаквано най-много болни с изострено ХБЗ са получавали АХ средства-29 (93.5%). Значимо е било приложението на диуретици-22-ма (68.8%) пациенти. Тринадесет болни (40.6%) са лекувани с НСПВС. Останалите групи медикаменти се подреждат по честота на приложение по следния начин: антидиабетни медикаменти-10 пациенти (31.3%); ксантиноксидазни инхибитори са прилагани при 9 (28.1%) лица; КС са получавали 8 (25.5%) болни. Само трима от групата (9.4%) са лекувани с цитостатици. На таблица 8 е представен дялът на медикаментите, приемани от пациентите с изострено ХБЗ.

Таблица 8. Дялово разпределение на приеманите медикаменти в групата с изострено ХБЗ

Групи медикаменти	Брой болни	Отн. дял в (%)
<i>Антихипертензива</i>	29	93.5
<i>Диуретици</i>	22	68.8
<i>НСПВС</i>	13	40.6
<i>Антидиабетни средства</i>	10	31.3
<i>Ксантиноксидазни инхибитори</i>	9	28.1
<i>Кортикостероиди</i>	8	25.5
<i>Цитостатици</i>	3	9.4

Сравни се приложението на различни класове медикаменти при лечението на пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ. Установи се, че дялт на болните с изострено ХБЗ, получавали антихипертензивно лечение  $p=0.01$  и диуретична терапия  $p=0.05$  е значимо по-голям. Дялт на приеманите медикаменти в двете групи е представен на фигура 15.



Фигура 15. Дял на приеманите медикаменти в групите с ОБУ и изострено ХБЗ.

При мъжете с ОБУ и изострено ХБЗ, статистическа значима разлика се установява единствено по отношение на антихипертензивната терапия. Тя е прилагана при 91.3% от мъжете с изострено ХБЗ,  $p=0.015$ . В същата група приложението на диуретици и ксантиноксидазни инхибитори е по-често, но без да достига сигнификантни различия. Очаквано в групата с ОБУ приемът на НСПВС и цитостатици е по-висок, но без да се отчита статистическа значимост. На фигура 16 е представено прилаганото медикаментозно лечение при двете групи мъже.



Фигура 16. Провеждано лечение при двете групи мъже с ОБУ и изострено ХБЗ

Не се установяват различия, свързани с прилагането на медикаментозните средства при пациентките с ОБУ и тези с изострено ХБЗ, ( $p>0.05$ ).



### ✓ **Промени в уринната находка**

При всички изследвани 100 лица няма пациенти с анурия. Само при 5 от болните е налице олигурия. Диурезата е от 300 до 3400 мл. Петима от пациентите с ОБУ са с олигурия. Не се отчита значително понижаване на диурезата- $1433.09 \pm 718.34$  мл/24ч в групата с ОБУ. При пациентите с изострено ХБЗ също няма отклонения в 24 часовата диуреза  $1534.38 \pm 590.71$  мл/24ч.

На всички 100 пациенти се проведе изследване на урина с тест ленти. При 65 (65.0%) пациенти се установи белтък. Еритроцитурия се регистрира при 44 (44.0%) болни, а левкоцитурия при 42-ма (42%). Пациентите с глюкозурия са 14 (14%), а тези с кетони в урината-четирима (4%). Само по 1 пациент (1%) има уробилиноген и нитрити в урината. Билирубин не се открива при никой в групата. От микроскопското изследване на уринния седимент най-масовата находка е левкоцитурия-при 42-ма (42.0%) болни, последвана от комбинация левкоцити с еритроцити- при 32-ма пациенти (32.0%) и еритроцитурия при 12 лица (12.0%).

При болните с ОБУ белтък в урината се намери при 41 (60.3%) пациенти, а еритроцитурия-при 31 (45.6%). Левкоцитурия се установи при 32-ма (47.1%) болни. При 9 (13.2%) лица от групата се регистрира глюкозурия. Кетотела се откриха при 3 (4.4%) болни, а уробилиноген само при 1 (1.5%) пациент. Нитрити в урината се намират само при един болен (1.5%). В уринния седимент преобладава комбинацията от левкоцити и еритроцити при 24 (35.3%) лица.

В групата с изострено ХБЗ белтък в урината се установи при 24 пациенти (75%), еритроцитурия се регистрира при 13 (40.6%), а левкоцитурия се намери при 10 (31.3%) болни. При 5-ма (15.6%) от пациентите се установи глюкозурия. Кетони в урината се откриха само при едно лице (1.5%). В уринния седимент най-масовата находка са левкоцити и еритроцити-8 (25%) болни. С еднаква честота се намират еритроцити и епителни клетки-при 4-ма пациенти (12.5%). Само при трима болни (9.4%) в седимента се регистрира комбинация от левкоцити и бактерии.

Сравни се уринната находка при болните с остро настъпила бъбречна увреда и изострено ХБЗ. Не се установяват сигнификантни различия в уринните показатели в двете групи (Таблица 9).

Таблица 9. Сравнение на уринните показатели в двете групи

Уринен показател	Болни с ОБУ Брой (%)	Болни с изострено ХБЗ Брой (%)	Ниво на значимост р
<i>Белтък</i>	41 (60.3)	24 (75.0)	0.11
<i>Еритроцитурия</i>	31 (45.6)	13 (40.6)	0.40
<i>Левкоцитурия</i>	32 (47.1)	10 (31.3)	0.10
<i>Кетотела</i>	3 (4.4)	1 (3.1)	0.62
<i>Билирубин</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
<i>Уробилиноген</i>	1 (1.5)	0 (0.0)	0.68
<i>Нитрити</i>	0 (0.0)	1 (3.1)	0.32
<i>Глюкозурия</i>	9 (13.2)	5 (15.6)	0.48

## МЕТОДИ

1. На всички пациенти беше снета подробна анамнеза с цел определяне на типа и вида на болестния процес на бъбреците; анамнестични данни за фактори, индуциращи развитието на ОБУ; анамнеза за предшестваща влошена бъбречна функция; търсене на болков, нефритен, нефрозен и метаболитен синдром, инфекции; информация за прием на медикаменти, повлияващи серумните нива на креатинина; минали и придружаващи заболявания; фамилна анамнеза за генетични болести и вродени малформации.
2. На всички участници е снет пълен физикален статус. Измерване на артериалното налягане с анероиден сфигмоманометър в седнало положение след поне 5 минутен покой, трикратно. На всички участници се измериха ръст (см), телесно тегло (кг), на базата на които се определи индекса на телесната маса (BMI) ( $\text{kg/m}^2$ ). ГФ се изчисли по формулата на Study Group and the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI creatinine-cystatin C) 2012 г. в ( $\text{mL/min/1.73m}^2$ ), която единствено може да се приложи при пациенти над 70 годишна възраст.
3. Диагнозите при проучените пациенти ( ОБУ, изострено ХБЗ, тубулоинтерстициален нефрит, ГН, Васкулити, ММ, болни с трансплантиран бъбрек ) са поставени според общоприети критерии. В изработената карта за проучване се събра информация от лист “История на заболяването”, температурен лист.
4. Ултразвуково изследване: на всички участници в проучването се осъществи В-мод абдоминална ехография, цветен, пулсов и power Doppler с апарат ESAOTE-MYLAB-60 и ALOKA. Оценката на тежестта на промените се извърши от няколко високо квалифицирани специалисти. На всички участници в проекта се определиха ехографски следните параметри: надлъжен размер на бъбреците, дебелина на бъбречният паренхим, индекс на съпротивление на бъбречните артерии, видимост на пирамиди и ехогенност на бъбречния кортекс. Промените в последния показател се стадират в четири степени: 0-ва

степен на ехогенност (нормална ехогенност); 1-ва степен- леко повишена ехогенност спрямо черния дроб; 2-ра степен на умерено повишена ехогенност; 3-та степен-трудно се отличава паренхим от ренален синус.

5. Микробиологични изследвания: Осъществиха се в Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, МУ-София. Изследваха се следните микробиологични материали: кръв и урина. Те са извършени чрез спазване на приетите правила за вземане, съхранение и транспорт на биологичните материали.
6. Лабораторни методи: Кръвта беше взета при стандартни условия-сутрин между 7:30 и 9:00 ч., на гладно, от кубиталната вена, между шести и двадесет и четвъртия час от хоспитализацията. Кръвните проби се разпределяха в четири вакутейнера и една хепаринизирана капилярка. Първият вакутейнер съдържа  $K_2EDTA$  за определяне на кръвна картина. Вторият е с Na цитрат за изследване на скоростта на утаяване на еритроцитите (СУЕ). Третият вакутейнер съдържа гел и клот активатор за изследване на биохимични показатели. В хепаринизирана капилярка се взима артериализирана капилярна кръв за алкално киселинно равновесие. Кръвните проби от трите вакутейнера и хепаринизираната капилярка се изследваха в един ден.

От четвъртия вакутейнер, съдържащ гел и клот активатор, серумът се отдели на стайна температура, след което се разпредели в 4 вторични епруветки тип Eppendorf и се замръзи при  $-20^{\circ}/-80^{\circ}$  C до анализа. Оцениха се следните показатели:

- sCysC
- sNGAL
- sIL-18

За оценка на бъбречната функция се изследва серумен креатинин по метода на Jaffe, който се основава на неспецифична цветна реакция и се изчисли GFR по формулата на СКД-EPI creatinine-cystatin C 2012 г. ( $mL/min/1.73m^2$ ).

Валидността на резултатите от двете лаборатории се гарантира с Европейски сертификат за качество на лабораторията през изследвания период и до момента.

На всички участници се събраха 2 уринни проби сутрин след сън. При пациенти с поставен уретрален катетър, уринната проба се взе от уринаторната торбичка след предварително запушване на катетъра за период от 2 часа. Общото количество урина, необходимо за изследването е 50 мл. От първата уринна проба се определиха рН, белтък, захар, кетони, еритроцити, левкоцити, уробилиноген в урината. Втората проба урина се прехвърли в полипропиленова епруветка с конусовидно дъно и се центрифугира при 1000 G за 20 минути. От надстоящата течност се отпипетира по 2 мл за n вторични епруветки тип Eppendorf. Изследваха се: uNAG и uKIM-1.

При пациентите с остър тубулоинтерстициален нефрит в резултат на уроинфекция се взе трета урина проба в стерилен вакутейнер за микробиологично изследване.

7. Специфични лабораторни методики: имунонефелометрия; ELISA “тип сандвич.” Чрез имунонефелометрия се определи CysC в серум, а чрез ELISA- NGAL, IL-18 в серум, KIM-1 и NAG в урина.

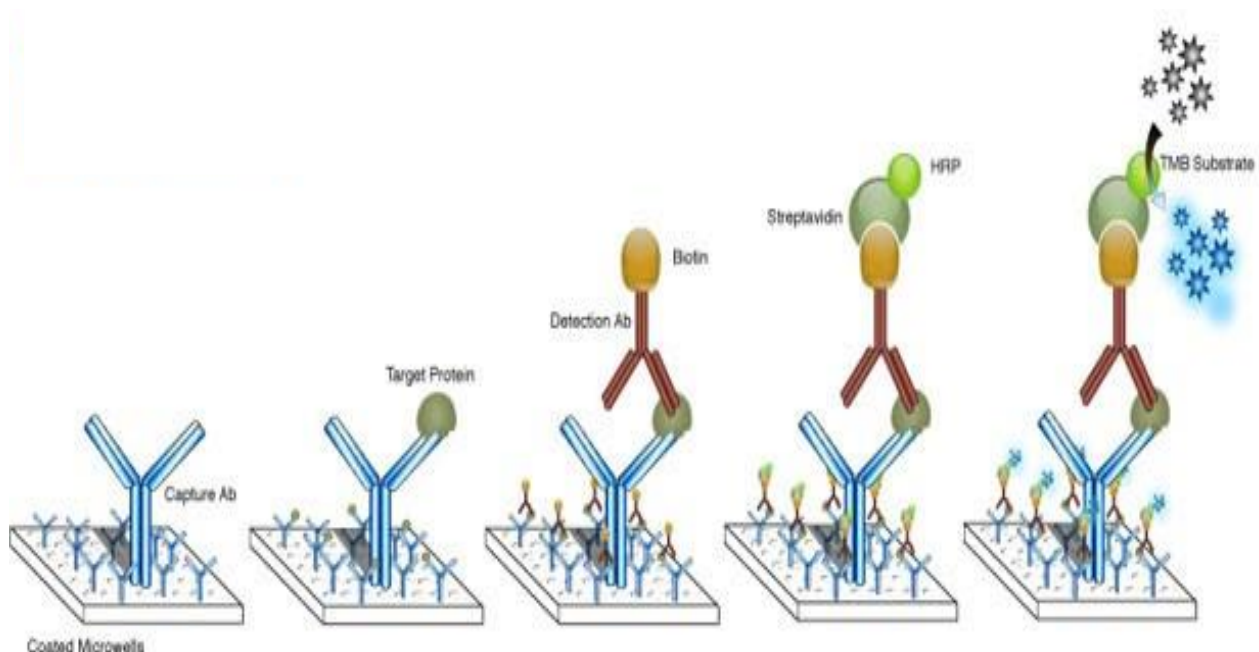
N Latex Cystatin C представлява кит за *in vitro* диагностика, съдържащ реагенти за количествено определяне на CysC в човешки серум и плазма чрез усилен имунонефелометрия, използвайки BN система. CysC се използва в диагностиката и лечението на бъбречните заболявания.

CysC е убиквитерен цистеин протеиназен инхибитор с молекулна маса 13,250 Da, синтезиран в ядрени клетки. Тъй като се синтезира в постоянно ниво и се филтрира свободно от здрави бъбреци, този белтък е добър маркер за бъбречна функция. Серумните концентрации на CysC зависят изцяло от скоростта на ГФ. Понижаването на ГФ води до повишаване концентрацията на CysC. Серумното ниво на CysC не се повлиява от мускулна маса и хранене-фактори, които оказват влияние върху стойностите на серумния креатинин.

## Принцип на метода

Настъпва агрегация на полистериновите частици, свързани със специфични за CysC антитела, когато бъдат смесени с проби, съдържащи CysC. Тези агрегати разсейват светлинния лъч, който минава през пробата. Интезивността на разсеяната светлина е пропорционална на концентрацията на CysC в пробата. Резултатът се оценява на базата на сравнение със стандарт с известна концентрация.

За определяне на sNGAL, sIL-18, uKIM-1 и uNAG е използван ELISA тип „сандвич“.



Фигура 17. Схематичен модел на ELISA тип „сандвич“.

(фигурата е взета от

<http://dc14.arabsh.com/i/03414/ksavwn1ei1f6.png> (<http://ww>)

ELISA тип сандвич за количествено определяне на човешки липокалин-2 (NGAL) с каталожен номер RD191102200R.

## Принцип на теста

Според стандартите на производителя на NGAL ELISA количествените контроли и проби се инкубират в кладенчета, обработени предварително с поликлонално анти-човешки липокалин-2 антитяло. Използва се ELISA отчитащо устройство с  $450 \pm 10$  nm филтър, за предпочитане с дължина на вълната 630 nm. След 1 час престой и измиване, се добавя белязано с биотин поликлонално анти-човешки липокалин-2 антитяло и се инкубира със захванатия липокалин-2 за още 1 час.

След повторно измиване се добавя конюгиран стрептавидин-пероксидаза (HRP). Следва трийсетминутна инкубация и последно измиване. Оставащият конюгат реагира със субстратния разтвор. Реакцията се спира чрез добавяне на кисел разтвор и се измерва абсорбцията на получения, жълто оцветен продукт. Абсорбцията е пропорционална на концентрацията на липокалин-2. Построява се стандартната крива чрез нанасяне стойностите на абсорбцията спрямо концентрацията на стандартите. Концентрациите на пробите се определят по калибрационната крива.

Пробите се анализират веднага след тяхното вземане или се съхраняват замразени при  $-20^{\circ}$  C. Серумните проби се разреждат 30-кратно с разреждащ буфер непосредствено преди анализа. Избягва се повторно замразяване на пробите.

При настоящето проучване са използвани референтни граници, предоставени от производителя, чието разпределение е в зависимост от възраст и пол и е представено в таблица 10.

Таблица 10. Възраст и пол зависимо разпределение на липокалин-2

Пол	Възраст (години)	№	Средна стойност ng/ml	Стандартно отклонение (SD) ng/ml	Долна граница ng/ml	Горна граница ng/ml	Среден диапазон (M) ng/ml
<b>Мъже</b>	13-18	6	43.4	23.3	17.4	87.0	39.9
<b>Мъже</b>	19-49	26	59.3	29.7	18.6	142.2	53.4
<b>Мъже</b>	50-85	54	62.5	33.4	14.4	169.2	53.4
<b>Жени</b>	6-18	6	61.3	34.2	21.0	114.6	66.5
<b>Жени</b>	24-50	38	75.3	33.9	13.8	145.2	67.8
<b>Жени</b>	51-83	67	64.9	46.5	21.6	276.0	51.0

ELISA метод за количествено определяне на човешки IL-18 с каталожен номер BMS267/2CE

Поставя се анти-човешки IL-18 антицяло в кладенчетата. IL-18, намиращ се в пробите или стандартите, се свързва към антителата, покриващи вътрешността на кладенчетата. Добавя се биотин-конюгирано анти-човешки IL-18 антицяло, което се свързва към човешкия IL-18, уловен от първото антицяло. Следва инкубиране, като несвързаното биотин-конюгирано анти-човешки IL-18 антицяло се отстранява по време на измиването. Добавя се Стрептавидин-HRP, който се свързва към биотин-конюгираното анти-човешки IL-18 антицяло. След второто инкубиране следва отстраняване на Стрептавидин-HRP при второто измиване. Накрая в кладенчетата се добавя субстрат от реактивен разтвор на HRP.

Формира се цветен продукт, с интензивност на оцветката пропорционална на нивото на човешкия IL-18, намиращ се в пробата или стандарта. Реакцията се прекъсва чрез прибавяне на киселина и абсорбцията се измерва при 450 nm. Стандартната крива се получава от 7 еквиливантни разтвора на калибратор с висока концентрация, като по нея се определя нивото в пробите. Комплектът реагенти се съхранява от 2° до 8° C, с изключение на контролите, които се съхраняват при -20° C. Пробите трябва да са



разделени на аликвоти и да се съхраняват замразени при -20 ° С, за да се предотврати загубата на биоактивен човешки IL-18. През следващите 24 часа преди тяхното изработване, пробите се съхраняват при температура от 2° до 8° С. По време на съхранението те не трябва да се замразяват повторно.

#### Очаквани стойности

На таблица 11 са представени използваните средни стойности, предоставени от производителя. Изследван е панел от 40 серума на произволно избрани здрави доброволци-мъже и жени. Измерените нива могат да варират в зависимост от събирането на пробите.

Таблица 11. Средни стойности на IL-18.

Проба	Брой на изследваните проби	Граница (pg/ml)	% на откриваемост	Средна откриваемост (pg/ml)
<b>Серум</b>	40	nd*-732.7	80.0	393.4

\*n.d.= неоткриваеми. Проби, измерени под най-ниския стандарт, се считат за неоткриваеми.

ELISA метод за количествено определяне концентрацията на KIM-1 в уринни проби, с каталожен номер H-RENA-E-001.

Разреден KIM-1 калибратор и уринни проби се добавят към разтвор на анти-KIM-1 Mab, където при наличие на KIM-1 се осъществява свързване към анти-KIM-1 антитяло. Така полученият комплекс антиген-антитяло свързва анти-KIM-1 антитялото към плаката. Добавя се второ анти-мишо антитяло, свързано с HRP, последвано от прибавяне на ABTS субстрат за откриване на човешки KIM-1 чрез ензимна конверсия, водеща до превръщане на безцветния субстрат в зелен. Промяната в цвета се оценява чрез измерване на оптичната плътност при 450 nm с корекция при 490 nm с помощта на ELISA отчитащо устройство. Абсорбцията на калибраторите се представя графично, като концентрациите на пробите се изчисляват по калибрационната крива. При всяко добавяне на реагент се изисква обстойно измиване. Проучването предвижда надеждни резултати за детекция на човешки KIM-1 при

концентрация  $\geq 80$  pg/ml. За анализа се предпочита първа сутрешна урина, от средна струя в стерилен контейнер. Центрофугира се за отстраняване на частиците и изследването се извършва веднага или се замразява при  $-20$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  след разделяне.

Приготвянето на калибратора за KIM-1 става чрез добавяне на 100  $\mu\text{l}$  от реконструиращия разтвор директно във виалката. Съставките се смесват и се оставят да престоят за 15 минути. Следва добавяне на 500  $\mu\text{l}$  от разрежения жълто-зелен уринен буфер. Реагентите се разбъркват внимателно преди изследване.

ELISA метод за определяне на NAG с каталожен номер MBS700742

#### Принцип на теста

Плаката е покрита предварително със специфично за NAG анти тяло. Стандартите и пробите се пипетират в кладенчетата заедно със свързан с HRP NAG. Стартира реакция на конкурентно инхибиране между NAG от пробите и свързания с HRP NAG. Следва измиване за отстраняване на останал несвързан реагент. Добавя се субстратен разтвор и се получава цветен продукт с интензивност на оцветката обратно пропорционална на количеството на NAG в пробата. Реакцията се спира чрез добавяне на стоп-разтвор и се отчита абсорбция. Аналитичният обхват на метода е между 5-2000 mIU/ml.

Ограниченията на метода са свързани с факта, че се използва само с изследователска цел. Ограничения произтичат от срока на годност на реактива. Не се препоръчва смесването или заместването с реагенти от други китове. При стойности на пробите, по-високи от най-високия стандарт, се изисква разреждане и повторно определяне. Всяко отклонение в техниката на пипетиране, измиване, време на инкубация или температура, както и в срока на годност на кита, може да доведе до получаване на грешен резултат. Биологичният материал е първа сутрешна урина от средна струя. Частиците се отстраняват чрез центрофугиране за 15 минути на 1000 оборота. Съхранението става при  $2-8^{\circ}\text{C}$ , ако анализът ще се извърши веднага или при  $-20^{\circ}\text{C}$ , с разделяне на пробите в аликвоти, ако изследването бъде осъществено по-късно. Препоръчително е да не се извършва повторно замразяване на

пробите. След като бъдат размразени, се извършва повторно центрофугиране за отстраняване на излишната утайка, която може да се появи след размразяването.

## 8. Статистически методи

Данните за количествените променливи с параметрично разпределение са представени със средни стойности и стандартно отклонение ( $M \pm SD$ ), а непараметрично разпределените променливи - с медиана и интреквартилен размах ( $Me; IQR$ ). Данните от проучването са обработени със софтуерни статистически пакети SPSS v. 23.0 IBM и EXEL for Windows:

- 1) дескриптивен анализ за представяне на честотното разпределение на различни демографски и клинични характеристики;
- 2) вариационен анализ за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическото разсейване;
- 3) тест на Колмогоров-Смирнов и Shapiro-Wilk за проверка на разпределенията за нормалност;
- 4) t-test на Student-Fisher за установяване на статистически значими разлики при количествените променливи с параметрично разпределение;
- 5) еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) за сравняване на две и повече независими извадки;
- 6) chi-square test при проверка на хипотези за наличие на зависимости при качествените променливи;
- 7) корелационен анализ с определяне коефициент на корелация (на Pearson и на Spearman) за изследване на връзката между две променливи;
- 8) графичен анализ-графично изобразяване на статистическите данни за онагледяване и анализ:
  - a) Receiver-Operating Characteristic (ROC) криви и изчислени Area Under the Curve (AUC) за оценка на чувствителността и

специфичността на лабораторните показатели. ROC-кривите представят нагледно способността на изпитвания показател да разграничи две здравни състояния. Колкото кривата е по-близо до горния ляв ъгъл, толкова тестът има по-висока диагностична стойност. Стойността на площта под кривата (ППК или AUROC) се движи между 0.5 и 1.0. Пълно разделяне на двете здравни състояния чрез даден показател може да се извърши при резултат 1.0. При установена площ под кривата 0.5, между двете групи няма различия по отношение на изпитвания показател. Площ под кривата, напр. 0.8, означава, че произволно избран индивид от болестната група има лабораторен резултат по-висок от произволно избран индивид от неболестната група в 80% от времето. ROC-кривите могат да се използват, за да се избере прагово ниво. Всяко вероятно прагово ниво отговаря на определена двойка чувствителност/специфичност, а всички тези двойки са изобразени на ROC-кривата.

Значимостта на теста и заключенията е определена при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛТАТИ

### ✓ *Разпределение на пациентите по причини довели до влошаване на бъбречната функция*

От проучените **100 пациенти** най-голям е броят на тези с тубулоинтерстициален нефрит-35 (35.0%). Следват с еднаква честота болните с диагнози исхемия и първични гломерулонефрити- по 22-ма (22.0%). Само 8 (8.0%) от проучваните пациенти са със системен васкулит на малките съдове. С най-малка честота в групата са лицата с бъбречна увреда, дължаща се на медикаментозна нефропатия-7 (7.0%) и такива с миеломна нефропатия-6 (6.0%). С нефропатия на графта са 7 пациенти, от които 5 имат първична гломерулна болест с първа изява на остър нефритен синдром на графта, а 2-ма са с остър тубулоинтерстициален нефрит и съпътстваща есенциална хипертония. На таблица 12 е представено разпределението на пациентите по причини за влошаване на бъбречната функция.

Таблица 12. Разпределение на 100 пациенти по заболявания, причинили влошаване на бъбречната функция

Бъбречна причина	Брой болни	Отн. дял в (%)
<i>Първични гломерулонефрити</i>	22	22.0
<i>Тубулоинтерстициален нефрит</i>	35	35.0
<i>Исхемия</i>	22	22.0
<i>Системен васкулит на малките съдове</i>	8	8.0
<i>Медикаментозна нефропатия-контрастни агенти, Антибиотици, НСПВС</i>	7	7.0
<i>Миеломна нефропатия</i>	6	6.0

От всички **лица с ОБУ** 27 (39.7%) болни са с остър тубулоинтерстициален нефрит и съпътстваща есенциална хипертония. Делът на пациентите с първични гломерулни болести с

първа изява на остър нефритен синдром е 14 (20.6%). Болните с исхемично ОБУ са 9 (13.3%). Със системен васкулит на малките съдове с първо бъбречно засягане, остра миеломна нефропатия и остра медикаментозна нефропатия като причини за ОБУ попадат по 6 (8.8%) лица. На таблица 13 е представено разпределението на пациентите по заболявания, довели до остро влошаване на бъбречната функция.

Таблица 13 Разпределение по заболявания, причинили остро влошаване на бъбречната функция

<b>Бъбречна причина</b>	<b>Брой болни</b>	<b>Отн. дял в (%)</b>
<b><i>*Първични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром</i></b>	14	20.6
<b><i>**Остър тубулоинтерстициален нефрит и съпътстваща есенциална хипертония</i></b>	27	39.7
<b><i>Исхемия</i></b>	9	13.3
<b><i>Системен васкулит на малките съдове с първо бъбречно засягане</i></b>	6	8.8
<b><i>Остра миеломна нефропатия</i></b>	6	8.8
<b><i>Остра медикаментозна нефропатия-контрастни агенти, Антибиотици, НСПВС</i></b>	6	8.8

\*Групата на болните с първични хронични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром, включва и трансплантирани пациенти (n=5) с нефропатия на графта, като причина за влошаване на бъбречната функция;

\*\*Групата пациенти с остър тубулоинтерстициален нефрит с есенциална хипертония съдържа: болни с остър бактериален пиелонефрит със съпътстваща есенциална хипертония (n=15); трансплантирани пациенти (n=2) с тубулоинтерстициален нефрит, като причина за влошване на бъбречната функция; пациенти с биопсично доказан тубулоинтерстициален нефрит, които са провели лечение с КС (n=10).

С **изострено ХБЗ** са 32.0%, като от тях 28 болни (87.5%) са с ХБЗ II ст., а 4-ма (12.5 %) са с ХБЗ III ст. При пациентите с изострено ХБЗ най-голям е дялът на тези с исхемично ОБУ с предшестващо ХБЗ-13 (40.6%). Болните с първични гломерулни болести с рецидив, протичащ с влошаване на бъбречната функция и хроничен тубулоинтерстициален нефрит със съпътстваща есенциална хипертония

са по 8 (25.0%). Малък е броят на пациентите със системен васкулит на малките съдове в непълна ремисия-2-ма болни (6.3%) и с хронична медикаментозна нефропатия-1 (3.1%). Заболяванията причинили изостряне на предшестващо ХБЗ са представени на таблица 14.

Таблица 14. Разпределение по заболявания причинили изостряне на предшестващо ХБЗ

<b>Бъбречна причина</b>	<b>Брой болни</b>	<b>Отн. дял в (%)</b>
<i>Първични гломерулни болести с рецидив, протичащ с вошаване на бъбречната функция</i>	8	25.0
<i>Хроничен тубулоинтерстициален нефрит със съпътстваща есенциална хипертония</i>	8	25.0
<i>Исхемия</i>	13	40.6
<i>Системен васкулит в непълна ремисия</i>	2	6.3
<i>Миеломна нефропатия</i>	0	0.0
<i>Хронична медикаментозна нефропатия- Антибиотици, НСПВС, контрастни агенти</i>	1	3.1

Съпоставиха се заболяванията, довели до влошаване на бъбречната функция при пациентите с ОБУ (n=68) и с изострено ХБЗ (n=32). Честота на исхемично увреждане е по-значима в групата с изострено ХБЗ (40.6%), спрямо болните в групата с ОБУ (13.3%). Не се установява значима разлика между двете групи в честотата на останалите заболявания, причинили влошаване на бъбречната функция. На фигура 18 е представено сравнението по заболявания довели до развитие на ОБУ и изострено ХБЗ.



Фигура 18. Сравнения по заболявания, причинили ОБУ и изострено ХБЗ

Проведе се сравнение по заболявания, довели до влошаване на бъбречната функция при мъжете с ОБУ (n=34) и при мъжете с изострено ХБЗ (n=24). Статистически значими различия се установяват по отношение на две нозологични единици: тубулоинтерстициален нефрит е диагностициран при 47.1% от пациентите с ОБУ в сравнение с 25.0% от другата група,  $p=0.05$ . Исхемично ОБУ без предхождащо ХБЗ е установено при 8.9% от пациентите, докато при болните с изострено ХБЗ делът на исхемичното увреждане е 41.6%,  $p=0.04$ . По отношение на останалите заболявания не се намират статистически достоверни различия. Разпределението по заболявания, влошили бъбречната функция при мъжете от двете групи е представено на фигура 19.





Фигура 19. Разпределение по заболявания, довели до влошаване на бъбречната функция при мъже

Извърши се сравнение по заболявания, довели до влошаване на бъбречната функция при жените с ОБУ (n=34) и при жените с изострено ХБЗ (n=8). Не се намират съществени различия между двете групи по отношение на заболяванията, причинили влошаване на бъбречната функция. Разпределението по заболявания, влошили бъбречната функция при жените от двете групи е представено на фигура 20.



Фигура 20. Разпределение по заболявания, довели до влошаване на бъбречната функция при жени

✓ **По продължителност на болничния престой**

Средната продължителност на болничния престой за групата с ОБУ е приблизително 8 дни (Me 7.00; IQR 3.00), докато при изострено ХБЗ този показател е 10 дни (7.66±2.47).

✓ **Усложнения по време на лечението**

По време на хоспитализацията 33/100 болни са включени по спешност на диализно лечение. В групата с ОБУ при 21/68 от пациентите се наложи провеждане на ХД лечение по време на болничният престой. При лицата с изострено ХБЗ спешно диализно лечение са провели 12/32 болни.

Съпостави се дялът на болните от всяка група, които по време на болничния престой са били включени на ХД лечение. При пациентите с изострено ХБЗ този дял е по-висок-37.5%. В групата с ОБУ диализираните болни са били-30.9%. Различията не достигат статистическа значимост,  $p=0.33$ .

Не се установяват сигнификантни различия между двата пола в групите по отношение на хронидиализно лечение,  $p > 0.05$ .

По отношение на жизнения статус не се достига статистическа значимост между двете групи,  $p=0.79$ .

✓ **Промени в лабораторните показатели оценяващи бъбречната функция**

Анализираха се промените в лабораторните показатели, оценяващи бъбречна функция- креатинин, урея, алкално –киселинно състояние при болните.

На всички пациенти се взе биологичен материал-серум и капилярна кръв по стандартизирани критерии между 6-ти и 24-ти час от хоспитализацията в клиниката. Гломерулната филтрация (GFR) се изчисли по формулата на CKD-EPI creatinine-cystatin C 2012 г. в ( $\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ ), която единствено може да се приложи и при пациенти над 70 годишна възраст.

**При всички 100 пациенти** се установи значимо повишаване стойностите на Scr  $400.40\pm 247.69 \mu\text{mol}/\text{l}$ , урея  $22.52\pm 11.36 \text{mmol}/\text{l}$  и пикочна киселина  $483.07\pm 461.92 \text{mmol}/\text{l}$ . ГФ е силно понижена  $21.25\pm 13.91 \text{ml}/\text{min}$ . GFR, намерена при изследваните болни е от 5.0  $\text{ml}/\text{min}$  до 73.0  $\text{ml}/\text{min}$ . При всички пациенти се изследва кръвно-газов анализ, който установи метаболитна ацидоза: Рн на кръвта  $7.33\pm 0.05$  и BE  $-8.69\pm 4.53 \text{mmol}/\text{l}$ .

**При пациентите с ОБУ (n=68)** се отчита сигнификантно повишени стойности на показателите за бъбречна функция: урея  $21.61\pm 10.23 \text{mmol}/\text{l}$ , Scr Me 303.00; IQR 411.00  $\mu\text{mol}/\text{l}$ , пикочна киселина  $486.68\pm 180.63 \text{mmol}/\text{l}$ . Отбелязва се значимо понижаване на скоростта на гломерулната филтрация  $21.59\pm 14.45 \text{ml}/\text{min}$ . Показателите за кръвно-газовия анализ демонстрират умерено декомпенсирана метаболитна ацидоза: рН Me 7.330; IQR 0.05; BE -  $9.03\pm 4.43 \text{mmol}/\text{l}$ .

В групата на **пациентите с изострено ХБЗ (n=32)** се отчита значимо повишаване на средните стойности на показателите Scr  $416.66\pm 250.09 \mu\text{mol}/\text{l}$ , урея  $24.46\pm 13.42 \text{mmol}/\text{l}$  и пикочна киселина  $475.06\pm 114.51 \text{mmol}/\text{l}$ . Силно понижената ГФ  $20.53\pm 12.86 \text{ml}/\text{min}$

потвърди очакванията ни. При всички пациенти се оцени алкално-киселинно състояние с рН на кръвта  $7.33 \pm 0.05$  и ВЕ  $-7.98 \pm 4.72$  mmol/l, което съответства на умерено декомпенсирана метаболитна ацидоза.

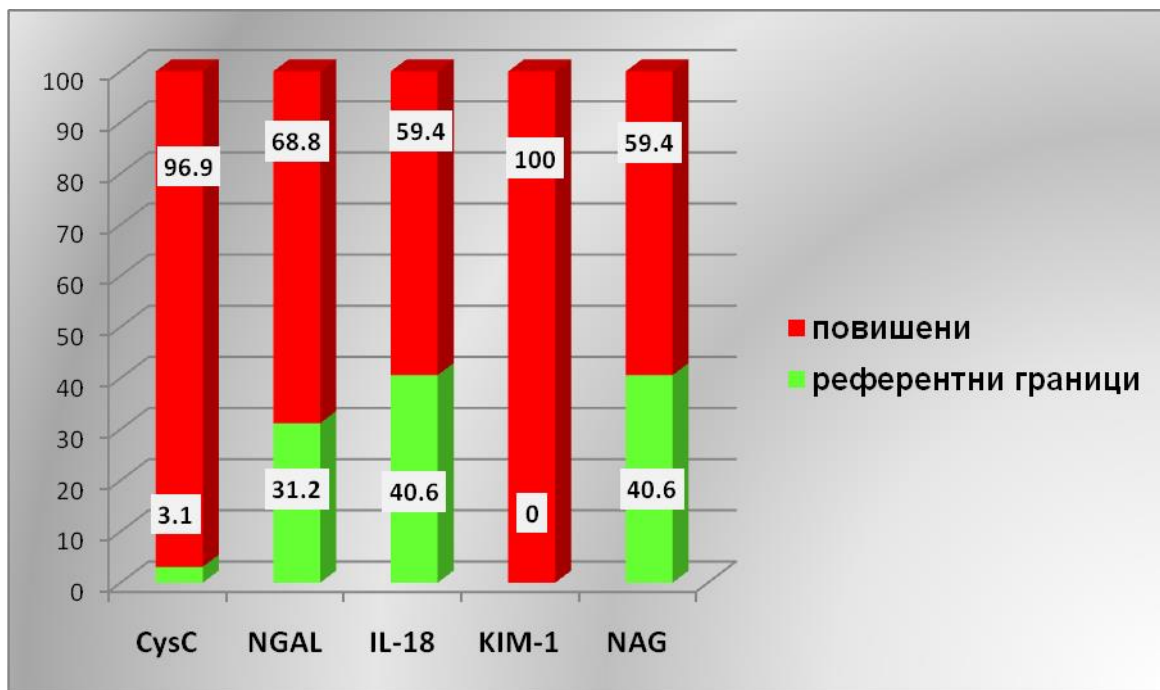
✓ **Промени в нивата на sCysC, sNGAL, sIL-18, uKIM-1 и uNAG при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ**

За определяне на диагностичната стойност на CysC, NGAL, IL-18 в серум и KIM-1, NAG в урина при всички пациенти беше взет биологичен материал- серум и прясна урина по стандартизирани критерии между 6-ти и 24-ти час от хоспитализацията в клиниката. Сравниха се нивата на Scr и петте оценявани БМ.

В това проучване се представят резултати от собствено изследване в изпълнение на поставените задачи. Резултатите са описани за пациентите с ОБУ (n=68) болни и изострено ХБЗ (n=32) лица.

Оцени се потенциала на петте БМ за диагностициране на ОБУ и изострено ХБЗ с хетерогенна етиология, както и тяхната специфичност и чувствителност.

От изследваните биомаркери в **групата с ОБУ**, най-значима промяна се регистрира при uKIM-1 със стойности на централна тенденция Me 1.48; IQR 2.08 ng/ml. Всички пациенти (100.0%) имат завишени нива на маркера. Много убедителни са данните за CysC- високи серумни нива със средна стойност  $2.84 \pm 1.29$  mg/l има при 98.5% лица от групата. При 88.2% от болните sNGAL е повишен 4-рикратно над нормата със средна стойност  $166.11 \pm 80.20$  ng/ml. sIL-18 показва двукратно наднормени нива със стойности на централна тенденция Me 434.30; IQR 308.32 pg/ml при 60.3% от пациентите. Едва при 44.1% от болните се отчита повишено ниво на uNAG със стойности на централна тенденция Me 107.80; IQR 1989.46 miu/ml. На фигура 21 е представен делът на пациентите с ОБУ с повишени нива на петте БМ.

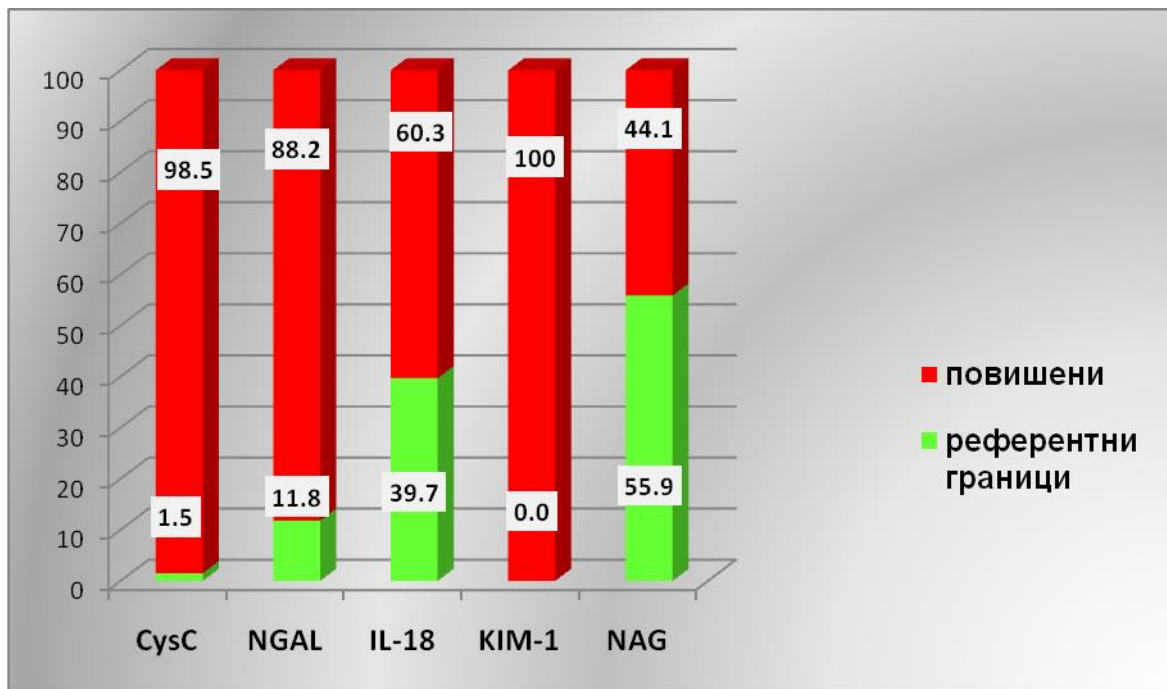


Фигура 21. Дял на пациентите с ОБУ с повишени нива на петте БМ

В групата с ОБУ се обособи подгрупа (n=16) с ранно влошена бъбречна функция и стойности на Scr до 150  $\mu\text{mol/l}$ . Оцениха се средните стойности на БМ в тази подгрупа спрямо останалите пациенти с ОБУ (n=52). Единствено sCysC показва съществени различия между сравняваните групи  $p=0.02$  и би могъл да се използва като ранен маркер за ОБУ.

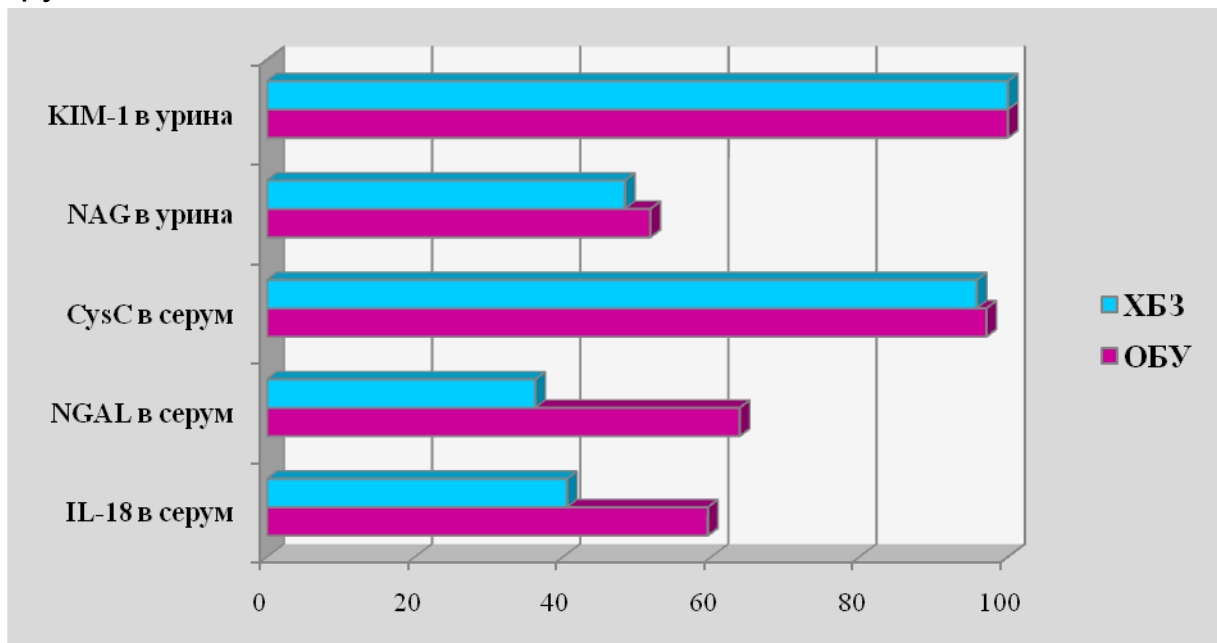
В групата с **изострено ХБЗ** се отчита значимо повишаване на стойностите на всички биомаркери. Нивото на sCysC е трикратно завишено със средна стойност  $2.74 \pm 1.17 \text{ mg/l}$  при 96.9% от болните. При 68.8% от пациентите с изострено ХБЗ, sNGAL е със средни стойности  $125.51 \pm 80.06 \text{ ng/ml}$  и се установява повишаване от 2 до 3 пъти над нормата. Същата тенденция се отчита и при sIL-18  $401.86 \pm 181.55 \text{ pg/ml}$  при 59.4% от болните. Подчертано се открояват двата биомаркера в урината-KIM-1 и NAG, които отбелязват по-значимо нарастване над горно-граничните стойности. Всички пациенти в тази група имат високо ниво на uKIM-1 Me 1.33; IQR 1.09  $\text{ng/ml}$ , което е четирикратно завишено над референтните стойности. uNAG отчетливо демонстрира значимо по-високи нива със стойности на централна тенденция Me 2001.00; IQR 1981.36  $\text{Miu/ml}$  при 59.4% от болните с изострено ХБЗ спрямо пациентите с ОБУ. На фигура 22 е представен дялът на пациентите с изострено ХБЗ с

повишени нива на петте БМ.



Фигура 22. Дял на пациентите с изострено ХБЗ с повишени нива на петте БМ.

На фигура 23 е представено сравнение на биомаркерите в двете групи пациенти.



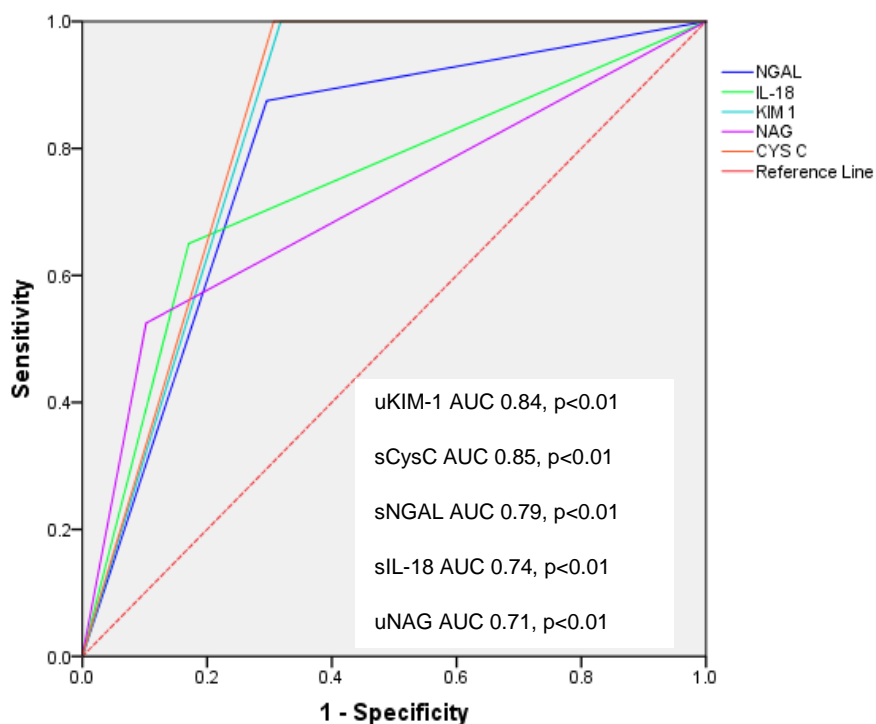
Фигура 23. Сравнение на петте БМ при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ

Scr е надежден, но не е високо специфичен показател за ОБУ и изисква разграничаване от случаите на преренална азотемия и ХБЗ. Промените в Scr могат да бъдат повлияни от редица екстраренални фактори, които не са в пряка връзка с бъбречната увреда. Недостатък на маркера е невъзможността да идентифицира мястото и причината за бъбречното засягане. Той се повишава приблизително на 72-рия час след настъпване на структурната увреда, а понижаването на ГФ предхожда повишението на Scr. При началните изследвания се препоръчва да се проследи Scr и ГФ, което е много по-точно отколкото самостоятелното определяне на Scr. По литературни данни, нови серумни и уринни БМ превъзхождат ГФ и Scr по диагностична стойност, поради високата им специфичност и чувствителност.

✓ ***Проучване на диференциалната способност на изследваните БМ при пациентите с ОБУ и с изострено ХБЗ.***

- **Анализ на ROC кривите при пациентите с ОБУ**

Диференциращата способност на новите биомаркери показва голяма площ под кривата при ROC анализа при пациентите с ОБУ спрямо Scr. С най-добра дискриминираща способност от тях е sCysC с AUC=0.847 [CI95% 0.781±0.912]. Неговата диагностична стойност е много близка до тази на Scr. Следващият маркер, с подобна на sCysC дискриминираща способност, е uKIM-1 AUC=0.841 [CI95% 0.775±0.907]. Следва sNGAL AUC=0.790 [CI95% 0.707±0.873], който е с много добра дискриминираща способност. Също с добра диференцираща стойност при ОБУ е и sIL-18 с AUC=0.740 [CI95% 0.641±0.839]. С най-ниска дискриминираща стойност от изследваните показатели, при оценката на ОБУ, е uNAG AUC=0.711 [CI95% 0.606±0.816] (Фигура 24 и таблица 15).



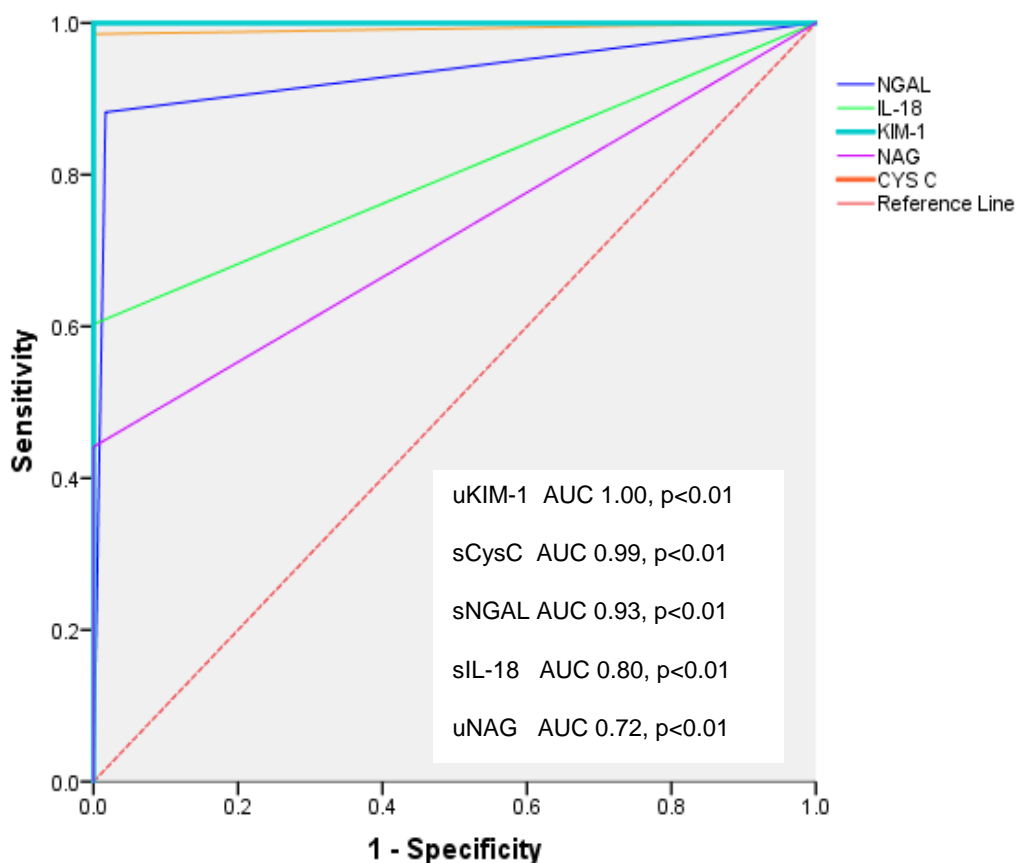
Фигура 24. ROC (receiver operator characteristic) криви при ОБУ.  
 Диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1/Scr, sCysC/Scr, sNGAL/Scr, sIL-18/Scr, uNAG/Scr по отношение диагностирането на ОБУ, измерен между 6-ти и 24-ти час от хоспитализацията

Таблица 15. Площ под кривата за диференциране на пациентите с ОБУ (n=68) спрямо Scr

Биомаркери	CI 95% Доверителен интервал		Чувствителност	Специфичност
	Долна граница	Горна граница		
NGAL ROC>53.4	0.707	0.873	70.45%	87.50%
IL18 ROC>393.4	0.641	0.839	82.95%	65.00%
KIM-1 ROC>300	0.775	0.907	68.18%	100%
NAG ROC>2000	0.606	0.816	89,47%	52.53%
CysC ROC>0.96	0.781	0.912	69.32%	100%



Диференциращата способност на новите биомаркери показва голяма площ под кривата при ROC анализа при пациентите с ОБУ спрямо GFR. С най-добра дискриминираща способност от тях е uKIM-1 AUC=1.000 [CI95% 1.000±1.000]. Неговата диагностична стойност е еднаква с тази на GFR. Следващият маркер, с приблизителна на uKIM-1 дискриминираща способност, е sCysC AUC=0.993 [CI95% 0.976±1.000]. Диагностичната му стойност е сходна с тази на GFR. Следва sNGAL AUC=0.933 [CI95% 0.884±0.982], който е с много добра дискриминираща способност. С добра диференцираща стойност при ОБУ е sIL-18 с AUC=0.801 [CI95% 0.723±0.880]. С най-ниска дискриминираща стойност от изследваните показатели, при оценката на ОБУ, е uNAG AUC=0.721 [CI95% 0.632±0.809] (фигура 25, таблица 16).



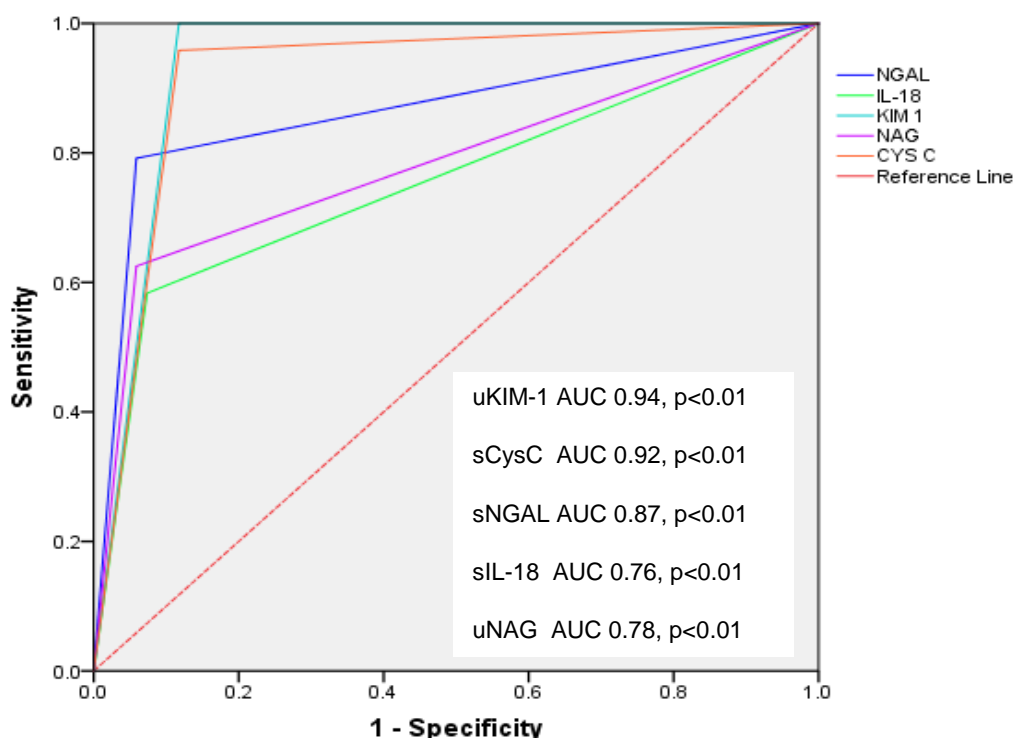
Фигура 25. ROC (receiver operator characteristic) криви при ОБУ. Диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1/eGFR, sCysC/eGFR, sNGAL/eGFR, sIL-18/eGFR, uNAG/eGFR по отношение диагностицирането на ОБУ, измерен между 6-ти и 24-ти час от хоспитализацията

Таблица 16. Площ под кривата за диференциране на пациентите с ОБУ (n=68) спрямо eGFR

Биомаркери	CI 95% Доверителен интервал		Чувствителност	Специфичност
	Долна граница	Горна граница		
NGAL ROC>53.4	0.884	0.982	88.24%	98.33%
IL18 ROC>393.4	0.723	0.880	60.29%	100%
KIM-1 ROC>300	1.000	1.000	100%	100%
NAG ROC>2000	0.632	0.809	44,12%	100%
CysC ROC>0.96	0.976	1.000	98.53%	100%

- **Анализ на ROC кривите при пациенти с изострено ХБЗ**

Диференциращата способност на новите биомаркери показва голяма площ под кривата при ROC анализа при групата с изострено ХБЗ спрямо Scr. При тези пациенти с най-добра диференциална способност също е uKIM-1 AUC=0.941 [CI95% 0.894±0.989]. Налице е близка до отлична диагностична способност с тази на Scr. sCysC има AUC=0.920 [CI95% 0.855±0.986] и заема второ място по диагностична достоверност. Тя също е близка до отличната. sNGAL има AUC=0.866 [CI95% 0.765±0.968] и показва много добра диференцираща стойност. uNAG има AUC=0.783 [CI95% 0.659±0.908] и демонстрира добра диференцираща способност. sIL-18 има AUC=0.755 [CI95% 0.626±0.883] и също показва добра дискриминираща способност (фигура 26, таблица 17).

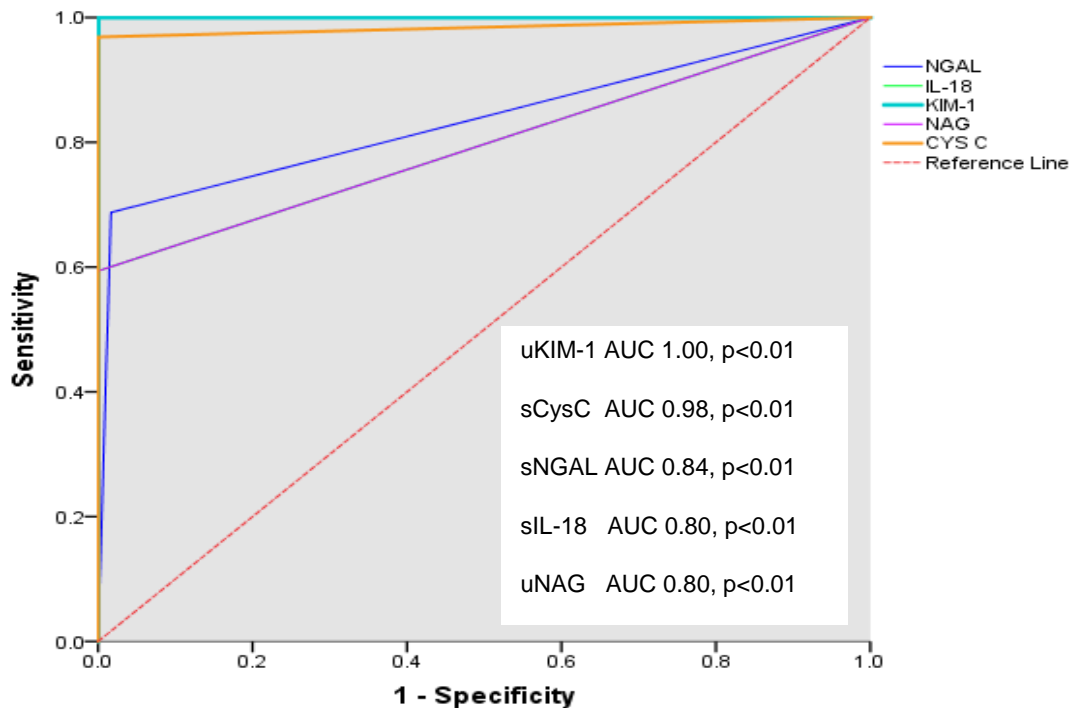


Фигура 26. ROC (receiver operator characteristic) криви при изострено ХБЗ. *Диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1/Scr, sCysC/Scr, sNGAL/Scr, sIL-18/Scr, uNAG/Scr по отношение диагностицирането на ОБУ, измерен между 6-ти и 24-ти час от хоспитализацията.*

Таблица 17. Площ под кривата за изследваните биомаркери при изострено ХБЗ спрямо Scr

Биомаркери	CI 95% Доверителен интервал		Чувствителност	Специфичност
	Долна граница	Горна граница		
NGAL ROC>53.4	0.765	0.968	94,12%	79.17%
IL18 ROC>393.4	0.626	0.883	92.65%	58.33%
KIM-1 ROC>300	0.894	0.989	88.24%	100%
NAG ROC>2000	0.659	0.908	94.12%	62.50%
CysC ROC>0.96	0.855	0.986	88.24%	95.83%

Диференциращата способност на новите биомаркери показва голяма площ под кривата от ROC анализа при групата с изострено ХБЗ спрямо GFR. При тези пациенти с най-добра диференциална способност също е uKIM-1 AUC=1.000 [CI95% 1.000±1.000]. Налице е съвпадение с диагностичната стойност на GFR, както в групата с ОБУ. sCysC AUC=0.984 [CI95% 0.949±1.000] заема второ място по диагностична достоверност. Тя е подобна с тази на GFR. sNGAL има дискриминараща стойност AUC=0.835 [CI95% 0.734±0.937]. Тя е по-ниска в сравнение с групата на пациентите с ОБУ. sIL-18 и uNAG са с еднаква диференциална способност AUC=0.797 [CI95% 0.686±0.908] (фигура 27, таблица 18).



Фигура 27. ROC (receiver operator characteristic) криви при изострено ХБЗ. Диагностична специфичност и чувствителност на uKIM-1/GFR, sCysC/eGFR, sNGAL/eGFR, sIL-18/eGFR, uNAG/eGFR по отношение диагностицирането на ОБУ, измерен между 6-ти и 24-ти час от хоспитализацията;

Таблица 18. Площ под кривата за изследваните биомаркери при изострено ХБЗ спрямо eGFR

Биомаркери	CI 95% Доверителен интервал		Чувствителност	Специфичност
	Долна граница	Горна граница		
NGAL ROC>53.4	0.734	0.937	68,75%	98.33%
IL18 ROC>393.4	0.686	0.908	59.38%	100%
KIM-1 ROC>300	1.000	1.000	100%	100%
NAG ROC>2000	0.686	0.908	59.38%	100%
CysC ROC>0.96	0.949	1.000	96.88%	100%

✓ **Сравнение на БМ по пол при двете групи пациенти**

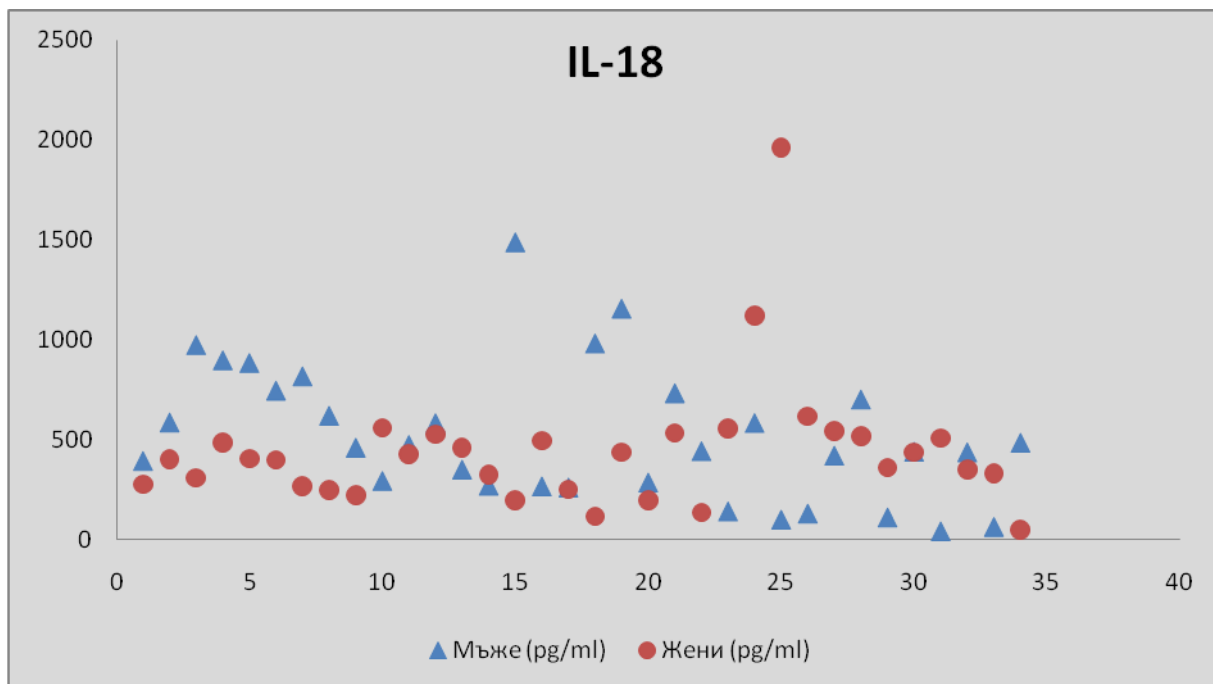
• **Сравнение на БМ по пол при пациентите с ОБУ**

Допълнително се сравниха стойностите на 5-те БМ при мъжете с ОБУ (n=34) и жените с ОБУ (n=34). Установяват се разлики в петте оценявани показатели при двата пола. Нивата на БМ са отчетливо по-високи при пациентите от мъжки пол, с изключение на sNGAL, който показва по-високи нива при жените. В таблица 19 са представени стойностите на 5-те показателя при двата пола и нивото на значимост.

Таблица 19. Сравнение на петте БМ по пол в групата с ОБУ

Биомаркер	Мъж		Жена		Ниво на значимост Р
	Me	IQR	Me	IQR	
<b>IL-18</b>	451.31	465.38	400.51	256.83	<0.05
<b>NGAL</b>	160.53	77.38	171.68	83.70	0.57
<b>CysC</b>	3.02	1.38	2.67	1.20	0.27
<b>KIM-1</b>	1.62	2.10	1.26	1.86	0.47
<b>NAG</b>	239.14	1991.81	77.20	1989.26	0.97

Сигнификантни различия се отбелязват само при sIL-18, чиито стойности са по-високи при мъжете спрямо жените. На фигура 28 са представени вариациите в стойностите на sIL-18 при двата пола в групата с ОБУ.



Фигура 28. Вариации в стойностите на sIL-18 при двата пола в групата с ОБУ.

- **Сравнение на БМ по пол при пациентите с изострено ХБЗ**

При сравняване стойностите на 5-те БМ при мъжете (n=24) и жените (n=8) с изострено ХБЗ не се установяват сигнификантни разлики в стойностите на маркерите при двата пола.

- **Сравнение на БМ между мъжете с ОБУ и изострено ХБЗ**

Проведе се сравнение на изследваните БМ по пол за пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ. При съпоставяне на мъжете с ОБУ и мъжете с изострено ХБЗ, статистически значими разлики се установяват само по отношение на NGAL в групата с ОБУ,  $p=0.01$ , представени на таблица 20.

Таблица 20. Сравнение на БМ в двете групи мъже

Биомаркери	ОБУ	Изострено ХБЗ	Ниво на значимост p
<i>IL-18 в серум</i>	59.5%	40.5%	p=0.863
<i>NGAL в серум</i>	63.8%	36.2%	p=0.01
<i>CysC в серум</i>	97.1%	95.8%	p=0.801
<i>NAG в урина</i>	51.75	48.3%	p=0.515
<i>KIM-1 в урина</i>	100.0%	100.0%	p>0.05

- **Сравнение на БМ между жените с ОБУ и изострено ХБЗ**

При сравняване на жените с ОБУ и тези с изострено ХБЗ, не се отчитат статистически значими разлики по отношение нивата на петте биомаркера. Резултатите са представени на таблица 21.

Таблица 21. Сравнение на БМ в двете групи жени

Биомаркери	ОБУ	Изострено ХБЗ	Ниво на значимост p
<i>IL-18 в серум</i>	55.9%	50.5%	p=0.764
<i>NGAL в серум</i>	88.2%	62.5%	p=0.113
<i>CysC в серум</i>	100%	100%	p>0.05
<i>NAG в урина</i>	44.1%	62.5%	p=0.596
<i>KIM-1 в урина</i>	100.0%	100.0%	p>0.05

- **Сравнение на БМ по възрастови групи при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ**

Проведе се сравнение по възрастови групи за пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ, като се потърси взаимовръзка между нивата на биомаркерите и възрастта на болните във всяка от групите. Пациентската група с ОБУ се раздели на две възрастови групи:



млади до 44 г., в която попаднаха 16 лица на средна възраст  $34.13 \pm 5.77$ . Старшата група  $\geq 45$ г, представена от 52-ма болни е със средна възраст  $64.25 \pm 9.60$ . Очаквано при възрастните пациенти серумният креатинин, урея и ВЕ са по-високи спрямо младите лица  $p=0.001$ . GFR е по-нисък при болните над 45 год.,  $p=0.001$ . Маркерът, който се отличава със сигнификантно по-високи стойности при пациентите над 45г. е CysC  $p=0.004$ . Другият маркер с по-високи нива при старшата възрастова група е IL-18  $p=0.004$ .

Не се отчита значима разлика между двете възрастови групи за NGAL  $p=0.417$ , KIM-1  $p=0.820$  и NAG  $p=0.154$ . В таблица 22 са представени нивата на БМ по възрастови групи на пациентите с ОБУ.

Таблица 22. Стойности на БМ по възрастови групи при пациентите с ОБУ

Биомаркер	18-44г. (n=16)		Над 45г. (n=52)		Ниво на значимост p
	M/Me	SD/IQR	M/Me	SD/IQR	
<b>CysC</b>	2.043	1.306	3.089	1.199	p=0.004
<b>NGAL</b>	151.750	82.503	170.522	79.764	p=0.417
<b>IL-18</b>	339.225	295.703	451.305	306.385	p=0.004
<b>KIM-1</b>	1.014	2.379	1.616	1.969	p=0.820
<b>NAG</b>	1118.042	1989.387	1107.796	1990.038	p=0.154

Потърси се взаимовръзка между нивата на биомаркерите и възрастта на **пациентите с изострено ХБЗ**. В младата група са 7 болни на средна възраст  $37.00 \pm 6.06$ . Старшата група е представена от 25 лица на средна възраст  $69.16 \pm 6.49$ . При младите пациенти се наблюдават по-високи стойности на Scr и GFR в сравнение със старшата група, без да се достига ниво на статистическа значимост,  $p > 0.05$ . Единственият биомаркер, при който се отчита сигнификантно по-високи стойности при младите болни е NAG  $p < 0.005$ . Не се намира значима разлика между двете възрастови групи по отношение NGAL  $p=0.862$ , IL-18  $p=0.447$ , KIM-1  $p=0.447$  и CysC  $p=0.606$ . Резултатите са представени на таблица 23.

Таблица 23. Стойности на БМ по възрастови групи при пациентите с изострено ХБЗ.

Биомаркер	18-44г. (n=7)		Над 45г. (n=25)		Ниво на значимост p
	M/Me	SD/IQR	M/Me	SD/IQR	
<b>CysC</b>	2.536	1.155	2.800	1.193	p=0.606
<b>NGAL</b>	131.283	85.017	124.175	80.399	p=0.862
<b>IL-18</b>	359.861	164.238	413.622	187.539	p=0.447
<b>KIM-1</b>	1.016	2.073	1.392	1.043	p=0.447
<b>NAG</b>	1718.343	747.841	1053.086	1007.155	p<0.005

Пациентите с изострено ХБЗ по време на хоспитализацията имат сигнификантно по-лоша прогноза, свързана с голям дългосрочен риск от ХД лечение и смърт. Болните с ХБЗ, често могат да влошат бъбречната функция, което налага допълнително наблюдение и изследване. Добрата клинична практика изисква мониториране на ХБЗ, което е сред водещите причини за изява на ОБУ. Това налага търсене на нови БМ, които могат да идентифицират продължителността на увредата и прогресията на ХБЗ до различните стадии.

**✓ Сравнение на нивата на 5-те биомаркера по продължителност и степен на влошаване на ХБЗ**

Анализирах се нивата на изследваните БМ при пациенти с изострено ХБЗ с различна продължителност и степен на влошаване на бъбречната функция.

**• Нива на маркерите в зависимост от продължителността на ХБЗ**

Лицата с изострено ХБЗ са разпределени в две групи по отношение продължителността на предшестващото ХБЗ(документация за минали заболявания): с продължителност до 2 години и болни с над 3-годишна давност. Тези с 2-годишна продължителност са общо 12 лица (37.5%), а болните с ≥3-годишна давност са 20 (62.5%). Резултатите са представени в таблица 24.

Таблица 24. Нива на маркерите при различна продължителност на ХБЗ

Маркер	Продължителност до 2 г.	Продължителност над 3 г.	Ниво на значимост p
<i>IL-18</i>	495.012±382.258	410.878±165.158	0.482
<i>KIM-1</i>	1.373; 2.624	1.587;3.225	0.366
<i>NAG</i>	1174.764±1021.198	1326.146±946.777	0.674
<i>NGAL</i>	112.454±61.557	145.729±86.348	0.253
<i>CysC</i>	3.042±1.350	2.930±1.275	0.815

\* Me; IQR

От проведения непараметричен анализ не се наблюдават статистически значими различия в нивото на БМ при пациентите с различна продължителност на ХБЗ.

- **Нива на маркерите по стадии на изострено ХБЗ**

Пациентите с изострено ХБЗ са разпределени в три стадия съобразно AKIN критериите за нарастване на серумния креатинин. Стадий 1-нарастване на Scr с  $\geq 27 \mu\text{mol/l}$  имат 11 пациенти (34.4%); стадий 2-покачване на Scr  $\geq 44 \mu\text{mol/l}$  се отчита при 15 болни (46.9%) и 3-ти стадий-повишаване на Scr с  $\geq 354 \mu\text{mol/l}$  имат едва 6 пациенти (18.8%). В таблица 25 са представени средните стойности на БМ.

Таблица 25. Средни стойности на БМ по стадии на ХБЗ

Маркери	Стадий	Брой пациенти	M/Me*	SD/IQR *	p
<b>IL-18</b>	1	11	374.295	120.890	p=0.820
	2	15	20.938	213.352	
	3	6	404.708	211.880	
<b>CysC</b>	1	11	1.966	0.933	p=0.03
	2	15	2.877	0.926	
	3	6	3.828	1.256	
<b>NAG</b>	1	11	736.254	1002.665	p=0.05
	2	15	1474.951	903.003	
	3	6	1355.415	1000.487	
<b>NGAL</b>	1	11	67.987	22.953	p=0.04
	2	15	148.767	86.639	
	3	6	172.847	77.952	
<b>KIM-1</b>	1	11	1.410	0.981	p=0.847
	2	15	1.305	1.224	
	3	6	1.187	1.554	
<b>Scr</b>	1	11	195.18	55.46	p=0.01
	2	15	422.20	137.64	
	3	6	808.83	189.780	

От извършения ANOVA и непараметричен анализ, статистически достоверни различия се демонстрират в нивата на sCysC (p=0.03), sNGAL (p=0.04), и uNAG (p=0.05) при болните по стадий на

изострена ХБЗ. Не се отбелязват статистически различия в нивата на sIL-18 ( $p=0.820$ ) и uKIM-1 ( $p=0.847$ ) в различните стадии.

При множествено сравняване на стойностите на маркерите между всеки от отделните стадии на ХБЗ с LSD-тест и тест на Bonferroni се установяват значими различия в нивата на sCysC между 1-ви и 2-ри стадий ( $p=0.028$ ), 1-ви и 3-ти ( $p=0.001$ ), както и между 2-ри и 3-ти стадий ( $p=0.05$ ). Намират се и значими различия в нивата на sNGAL при сравнение на 1-ви с 2-ри стадий ( $p=0.005$ ), както и на 1-ри с 3-ти ( $p=0.05$ ) стадий ХБЗ. Не се отбелязват сигнификантни разлики в нивото на маркера между 2-ри и 3-ти стадий. При uNAG се отбелязват различия между 1-ви и 2-ри, както и между 1-ви и 3-ти стадии. При анализ на стойностите на sNGAL и sCysC прави впечатление, че те нарастват правопрпорционално на стадия.

**✓ Корелации между 5-те биомаркера със серумния креатинин и гломерулна филтрация при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ.**

БМ като проява на структурна увреда бяха оценени при ОБУ и изострено ХБЗ. Стойностите над горнореферентната граница, определена от производителя, се приеха за повишени. Потърсихме количествена зависимост между изследваните БМ със Scr и eGFR, които се прилагат рутинно в ежедневната клинична практика.

**• Корелации на 5-те БМ със серумния креатинин Scr и eGFR при цялата пациентска популация ( $n=100$ )**

Потърсиха се корелации на 5-те БМ със Scr и GFR при цялата пациентска популация. Наличието на количествена зависимост между изследваните пет биомаркера със серумния креатинин и ГФ се проведе с помощта на корелационен анализ. Изчислени са корелационни коефициенти  $R/\rho$  в зависимост от типа на променливите.

**• Корелация на маркерите със SCR**

От проведения анализ се установи, че четири от показателите корелират със Scr, като най-значима е зависимостта му със sCysC,

умерена със sNGAL, sIL-18 и uNAG. uKIM-1 показва слаба връзка със Scr. Зависимостта на маркерите е представена в таблица 26.

Таблица 26. Корелация на петте БМ със Scr при 100 пациенти

Scr	CysC mg/l	NGAL ng/ml	IL-18 pg/ml	NAG Miu/ml	KIM-1 ng/ml
<b>Корелационен коэффициент <math>\rho</math></b>	0.650	0.322	0.321	0.363	0.154
Ниво на значимост P	0.001	0.02	0.03	0.02	0.12
Брой лица	100	100	100	100	100

- **Корелация на маркерите с GFR**

Намери се голяма отрицателна корелационна връзка между GFR и sCysC ( $\rho=-0.89$ ,  $p=0.001$ ). Останалите маркери демонстрират умерена отрицателна зависимост с показателя. uKIM-1 показва слаба връзка с GFR. (Таблица 27).

Таблица 27. Корелация на БМ с GFR при 100 пациенти

GFR	CysC mg/l	NGAL ng/ml	IL-18 pg/ml	NAG Miu/ml	KIM-1 ng/ml
<b>Корелационен коэффициент <math>\rho</math></b>	-0.889	-0.382	-0.391	-0.384	-0.103
Ниво на значимост P	0.001	0.04	0.03	0.03	0.31
Брой лица	100	100	100	100	100

- **Корелации на 5-те БМ със Scr и eGFR при пациентите с ОБУ (n=68)**

Потърсиха се корелации на 5-те БМ със Scr и eGFR при пациентите с ОБУ-68 лица. Анализираха се нивата на изследваните биомаркери и стойностите на Scr и на eGFR, за да се установи съществуват ли значими зависимости между тях.

- **Корелации на маркерите със Scr:**

От извършения анализ се установява значима зависимост между серумния креатинин и sCysC ( $R=0.64$ ,  $p=0.001$ ) и умерена зависимост със sNGAL ( $R=0.44$ ,  $p=0.05$ ). От анализа на непараметричните променливи се намира умерена зависимост между креатинина и sIL-18 ( $\rho=0.30$ ,  $p=0.03$ ). uKIM-1 и uNAG не показват връзка с креатинина. Описаните зависимости са представени в таблица 28.

Таблица 28. Корелация на 5-те БМ със Scr при ОБУ

		CysC mg/l	IL-18 pg/ml	KIM-1 ng/ml	NAG Miu/ml	NGAL ng/ml
Креатинин	<b>Корелационен коефициент R</b>	0.643**	0.302*	0,191	0,187	0,441
	<b>Значимост P</b>	0,001	0,03	0,118	0,128	0,05
	Брой лица	68	68	68	68	68

- **Корелация на маркерите с eGFR:**

Установява се значима зависимост между sCysC и eGFR, като sCysC показва силна отрицателна връзка с нея. sIL-18 и sNGAL имат умерена отрицателна зависимост с eGFR. uKIM-1 и uNAG не показват зависимост с показателя. Намерените връзки са представени в таблица 29.

Таблица 29. Корелация на 5-те БМ с eGFR при ОБУ

		CysC mg/l	IL-18 pg/ml	KIM-1 ng/ml	NAG Miu/ml	NGAL ng/ml
Гломерулна филтрация	Корелационен коэффициент R	0.781 **	-0.302 *	0,138	0,151	-0,456
	Значимост P	0,001	0,03	0,263	0, 218	0,01
	Брой лица	68	68	68	68	68

- **Корелации на 5-те БМ със Scr и eGFR при пациентите с с изострено ХБЗ (n=32)**

- **Корелация на маркерите със Scr:**

От анализа на параметричните показатели се намери значима корелация на Scr със sCysC ( $R=0.659$ ,  $p=0.001$ ) и умерена със sNGAL ( $R=0.482$ ,  $p=0.05$ ). При изследваната група липсват корелационни зависимости между непараметричния uKIM-1 и параметричните показатели sIL-18 и uNAG с креатинина.

- **Корелации на маркерите с eGFR:**

ГФ демонстрира голяма отрицателна зависимост със sCysC ( $R=-0.820$ ,  $p=0.001$ ) и значителна, също отрицателна зависимост със sNGAL ( $R = -0.544$ ,  $p=0.01$ ). Умерена отрицателна връзка се наблюдава с uNAG ( $R = -0.404$ ,  $p=0.02$ ). В таблица 30 е представена корелацията на маркерите с GFR.



Таблица 30. Корелации на sCysC, sNGAL и uNAG с eGFR при пациентите с изострено ХБЗ

		CysC mg/l	NGAL ng/ml	NAG Miu/ml
Гломерулна филтрация	<b>Корелационен коефициент R</b>	-0.820	-0,544	-0,405
	<b>Значимост P</b>	0,001	0, 01	0,02
	Брой лица	32	32	32

**✓ Корелация между 5-те БМ, зависимост с други клинични и лабораторни показатели при болните с ОБУ и изострено ХБЗ**

Анализирани са зависимостите на петте биомаркера както по между им, така и с други клинични и лабораторни параметри при цялата пациентска популация, при болните с ОБУ и тези с изострено ХБЗ. Установяват се редица корелации.

**• Корелационни коефициенти при 100 болни**

CysC показва голяма зависимост с KIM-1 и демонстрира значителна зависимост със sNGAL, sIL-18 и NAG. Корелациите на маркера са представени в таблица 31.

Таблица 31. Корелация на CysC с останалите БМ при 100 пациенти

CysC	NGAL	IL-18	KIM-1	NAG
Корелационен коефициент R	0.612	0.579	0.702	0.641
Ниво на значимост p	0.01	0.01	0.01	0.01

sNGAL илюстрира значителна зависимост със sCysC и uKIM-1. Умерена е зависимостта му с останалите биомаркери (Таблица 32).

Таблица 32. Зависимост на sNGAL с другите биопараметри при 100 пациенти

NGAL	CysC	IL-18	KIM-1	NAG
Корелационен коефициент R	0.612	0.531	0.568	0.433
Ниво на значимост p	0.01	0.01	0.01	0.01

sIL-18 демонстрира значима зависимост със sCysC и uKIM-1, а умерена със sNGAL и uNAG (Таблица 33).

Таблица 33. Връзка на sIL-18 с останалите БМ при 100 пациенти

IL-18	CysC	NGAL	KIM-1	NAG
Корелационен коефициент R	0.579	0.531	0.475	0.341
Ниво на значимост p	0.01	0.01	0.01	0.01

Зависимостта на uKIM-1 със sCysC е голяма, а с останалите биомаркери е умерена, с изключение на uNAG, където връзката е слаба. Зависимостта на uKIM-1 с останалите параметри е представена на таблица 34.

Таблица 34. Корелация на uKIM-1 с другите БМ при 100 пациенти

KIM-1	CysC	NGAL	IL-18	NAG
Корелационен коефициент R	0.702	0.323	0.475	0.152
Ниво на значимост p	0.01	0.01	0.01	0.055

uNAG илюстрира значителна връзка със sCysC и умерена с останалите биологични маркери, с изключение на uKIM-1. Корелацията на uNAG с БМ е представена на таблица 35.

Таблица 35. Корелация на uNAG с БМ при 100 пациенти

NAG	CysC	NGAL	IL-18	KIM-1
Корелационен коефициент R	0.641	0.433	0.341	0.152
Ниво на значимост p	0.01	0.01	0.01	0.055

- **Корелации на БМ по между им, зависимост с клинични и лабораторни показатели при пациентите с ОБУ**

Анализираха се стойностите на изследваните биомаркери и стойностите на урея, пикочна киселина, рН на кръвта, ВЕ, серумен К, САп, ДАН, диуреза, възраст и ВМІ, за да се установи съществуват ли значими зависимости между отделните биомаркери от една страна и клиничните и лабораторни показатели от друга. Потърси се и корелация между БМ и прилаганото лечение.

- **Параметрични променливи:**

Намира се умерена зависимост между параметричния sCysC и непараметричния показател sIL-18 ( $\rho=0.361$ ,  $p=0.03$ ), като корелацията е позитивна-с нарастване на IL-18 се увеличава и sCysC. Наблюдава се обратна корелация между стойностите на sCysC със sNGAL ( $R=-0.278$ ,  $p=0.055$ ), които са на границата на статистическата достоверност. Не се установяват значими корелации при останалите биомаркери.

Намират се значими зависимостите между sCysC и параметрите урея, пикочна киселина, BE, диуреза и възраст.

Значителна е зависимостта на маркера с уреята. sCysC демонстрира умерена зависимост с пикочна киселина и възраст. Налице е умерена отрицателна връзка с pH на кръвта, BE и диуреза. (Таблица 36).

Таблица 36. Корелация на sCysC с клинични и лабораторни показатели при пациентите с ОБУ

CysC	Урея	Пикочна киселина	pH на кръвта	BE	Диуреза	Възраст
Корелационен коефициент R	0.586	0.301	-0.464	-0.531	-0.329	0.363
Ниво на значимост P	0.001	0.01	0.01	0.001	0.05	0.03

- **Непараметрични променливи**

Установява се умерена отрицателна зависимост на непараметричния показател sIL-18 с pH на кръвта и BE. (Таблица 37).

Таблица 37. Корелация на sIL-18 с клинични и лабораторни показатели при пациентите с ОБУ

IL-18	CysC	pH на кръвта	BE
Корелационен коефициент $\rho$	0.361	-0.370	-0.345
Ниво на значимост P	0.03	0.02	0.04

sNGAL показва умерена зависимост с диурезата R 0.324,  $p=0.05$  и с BMI R 0.349,  $p=0.04$  (Таблица 38)

NGAL	Диуреза	BMI
Корелационен коефициент R	0.324	0.349
Ниво на значимост P	0.05	0.04

NAG в урина показва умерена корелация с пикочна киселина и възраст, като при последните два параметъра връзката е отрицателна, отразено в Таблица 39.

Таблица 39. Корелация на uNAG с клинични и лабораторни показатели при пациентите с ОБУ

NAG	Възраст	Пикочна киселина
Корелационен коефициент $\rho$	-0.342	-0.321
Ниво на значимост P	0.04	0.05

uKIM-1 показва ниска степен на корелация с останалите клинични и лабораторни показатели.

- **Корелации на БМ по между им, зависимост с клинични и лабораторни показатели при пациентите с изострено ХБЗ**

Потърси се корелация между проучваните БМ, както по между им, така и с останалите клинични и лабораторни показатели при пациентите с изострено ХБЗ. Анализира се връзката между БМ и прилаганото лечение (антихипертензива, диуретици, НСПВС, ксантиноксидазни инхибитори, АБ, КС, цитостатици).

sCysC разкрива значима положителна зависимост със sNGAL и uNAG. Не се регистрират значими корелации с останалите маркери. Връзката на sCysC с урея също е значителна. В таблица 40 е представена зависимостта на маркера със sNGAL, uNAG и урея.

Таблица 40. Корелация на sCysC с останалите БМ и лабораторни показатели при пациентите с изострено ХБЗ

CysC	NGAL	NAG	Урея
Корелационен коефициент R	0.585	0.572	0.618
Ниво на значимост P	0.05	0.05	0.001

sNGAL се характеризира с еднаква, значителна по степен корелация с урея и ВЕ и умерена с рН на кръвта, като с последните два показателя зависимостта е обратна. Тези зависимости са представени на таблица 41.

Таблица 41. Корелация на sNGAL с лабораторните параметри при пациентите с изострено ХБЗ

NGAL	Урея	рН на кръвта	ВЕ
Корелационен коефициент R	0.549	-0.423	-0.539
Ниво на значимост P	0.01	0.02	0.001

sIL-18 проявява умерена по сила зависимост със САН и ДАН (таблица 42).

Таблица 42. Корелация на sIL-18 със САН и ДАН

IL-18	САН	ДАН
Корелационен коефициент R	0.360	0.420
Ниво на значимост P	0.04	0.02

При uNAG се отчита умерена отрицателна връзка с възрастта и САН, представена в таблица 43.

Таблица 43. Корелация на uNAG с клинични параметри при болните с изострено ХБЗ.

NAG	Възраст	САН
Корелационен коефициент R	-0.437	-0.335
Ниво на значимост P	0.04	0.05

При uKIM-1 се установи ниска степен на корелация с оценяваните клиничните и лабораторни показатели.

Не се отбелязва зависимост на изследваните биологични маркери с прилаганите антихипертензива, диуретици, НСПВС, урикозурици, АБ, КС, цитостатици,  $p > 0.05$

✓ **Оценка на различия в нивата на БМ при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ с различни причини за бъбречна увреда.**

Потърсиха се различия в стойностите на БМ при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ с различни причини за бъбречна увреда

- **Сравнение в нивата на БМ при пациентите с ОБУ и изострено ХБЗ с различни причини за бъбречно увреждане**

Сравниха се стойностите на 5-те биологични маркери в двете групи-ОБУ и изострено ХБЗ, по отношение патолофизиологичната причина, довела до влошаване на бъбречната функция.

При пациентите с първични голмерулни болести, протичащи с влошаване на бъбречната функция не се установяват съществени различия в стойностите на параметрично и непараметрично разпределените променливи. Резултатите са представени на таблица 44.



Таблица 44. Стойности на 5-те БМ при първични голмерулни болести, протичащи с влошаване на бъбречната функция

МАРКЕРИ	ОБУ		Изострено ХБЗ		Ниво на значимост p
	M/Me	SD/IQR	M/Me	SD/IQR	
<b>NGAL</b>	173.46	75.59	112.97	93.13	p>0.05
<b>CysC</b>	2.73	1.30	2.52	1.06	p>0.05
<b>IL-18</b>	344,81	216,92	358,61	321,60	p>0.05
<b>KIM-1</b>	1,39	1,48	1,19	0,92	p>0.05
<b>NAG</b>	1057,64	1990,81	2001,1	1472,79	p>0.05

\* - Me; IQR

Значимо по-високи стойности на sNGAL се регистрират при болните с остър тубулоинтерстициален нефрит, p=0.001. За останалите четири биомаркери (sCysC, sIL-18, uKIM-1 и uNAG) не се откриват разлики в двете групи. Таблица 45 представя стойностите на 5-те БМ при интерстициален нефрит като причина за влошаване на бъбречната функция.

Таблица 45. Стойности на 5-те биомаркера при тубулоинтерстициален нефрит

МАРКЕРИ	ОБУ		Изострено ХБЗ		Ниво на значимост p
	M/ME	SD/R	M/ME	SD/R	
<b>NGAL</b>	195.63	58.07	104.06	63.60	0.001
<b>CysC</b>	2.84	1.48	2.19	1.26	p>0.05
<b>IL-18</b>	459,89	344,24	373,63	172,31	p>0.05
<b>KIM-1</b>	1,53	2,001	1,30	1,21	p>0.05
<b>NAG</b>	101,30	1989,10	1026,36	1992,05	p>0.05

При пациентите с исхемично ОБУ с предхождащо ХБЗ прави впечатление по-високите стойности на sCysC, в сравнение с групата

с исхемично ОБУ без предхождащо ХБЗ,  $p=0.05$ . Не се отбелязват различия в нивата на другите биомаркери. (таблица 46).

Таблица 46. Стойности на 5-те биомаркера при исхемично бъбречно увреждане

МАРКЕРИ	ОБУ		Изострено ХБЗ		Ниво на значимост $p$
	М/МЕ	SD/R	М/МЕ	SD/R	
<i>NGAL</i>	169.90	94.39	147.10	84.33	$p>0.05$
<i>CysC</i>	2.28	1.00	3.13	1.12	0.05
<i>IL-18</i>	399,10	510,81	492,21	246,27	$p>0.05$
<i>KIM-1</i>	1,89	1,22	1,40	1,72	$p>0.05$
<i>NAG</i>	13,64	1016,15	106,09	1984,11	$p>0.05$

В групата на болните със васкулит на малките съдове с бъбречно засягане се установява значимо различие само в стойностите на *sIL-18* при болните с ОБУ,  $p=0.04$ , представено в таблица 47.

Таблица 47. Стойности на 5-те биомаркера при васкулит на малките съдове с бъбречно засягане

МАРКЕРИ	ОБУ		Изострено ХБЗ		Ниво на значимост $p$
	М/МЕ	SD/R	М/МЕ	SD/R	
<i>NGAL</i>	130.28	82.27	134.24	111.86	$p>0.05$
<i>CysC</i>	2.93	1.03	3.30	1.72	$p>0.05$
<i>IL-18</i>	453,95	712,26	204,91	358.15	0.04
<i>KIM-1</i>	3,63	4,12	1,75	n.a*	$p>0.05$
<i>NAG</i>	1031,21	1980,97	n.a*	n.a*	$p>0.05$

\* - много малък брой случаи

Всички пациенти с миеломна нефропатия са с ОБУ, поради което не се направи сравнение на изследваните биомаркери спрямо групата с изострено ХБЗ.

- **Сравнение на стойностите на 5-те БМ между отделните групи заболявания, довели до изява на ОБУ**

При сравнение на средните стойности на параметрично разпределените показатели sNGAL и sCysC между отделните патофизиологични групи, се установяват съществени различия само за стойностите на sNGAL ( $F=2,62$ ;  $p=0,03$ ). Нивата на sCysC са високи при всички пациенти и не показват статистически значими разлики между отделните групи. (Таблица 48).

Таблица 48. Средни стойности на sNGAL при различните заболявания довели до ОБУ

<b>Заболявания</b>	<b>Стойности на NGAL ng/ml</b>
<i>Първични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром</i>	173.46
<i>Остър тубулоинтерстициален нефрит</i>	195.63
<i>Ишемия</i>	169.90
<i>Системен васкулит на малките съдове с първо бъбречно засягане</i>	130.28
<i>Остра миеломна нефропатия</i>	105.82
<i>Остра медикаментозна нефропатия</i>	106.52

Анализът продължи с оценка на различията между отделните групи за двата биомаркера. Стойностите на sNGAL при пациентите с първични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром са значимо по-високи в сравнение с болните с остра

миеломна нефропатия, където има тубуло-интерстициални промени. Маркерът е завишен и в групата с остра медикаментозна нефропатия като причина за развитие на ОБУ, ( $p_{\text{остра миеломна нефропатия}}=0,05$ ;  $p_{\text{остра медикаментозна нефропатия}}=0,05$ ). Значими разлики се наблюдават в нивата на NGAL при сравнение между пациентите с остър тубулоинтерстициален нефрит, спрямо групите с остра миеломна нефропатия и остра медикаментозна нефропатия. Намират се завишени нива на маркера в двете групи, които достигат статистически достоверни различия, ( $p_{\text{остра миеломна нефропатия}}=0,011$ ;  $p_{\text{остра медикаментозна нефропатия}}=0,011$ ).

При сравняване на групите исхемично ОБУ и остра миеломна нефропатия се установяват сигнификантни разлики в стойностите на sCysC в групата с миеломен бъбрек, ( $p_{\text{остра миеломна нефропатия}}=0,02$ ).

Стойностите на sCysC при пациентите с остра миеломна нефропатия са гранични при сравнение на болните с първични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром и остър тубулоинтерстициален нефрит ( $p_{\text{първични гломерулни болести с нефритен синдром}}=0,054$ ;  $p_{\text{остър тубулоинтерстициален нефрит}}=0,058$ ).

При сравнение на средните стойности на непараметричните показатели sIL-18, uNAG и uKIM-1 между различните нозологични групи не се намериха съществени различия.

- **Сравнение на стойностите на 5-те БМ между отделните групи заболявания, довели до изява на изострено ХБЗ**

За показателите с непараметрично разпределение се направи анализ с тест на Kruskal-Wallis и Independent Median test. Стойностите на sIL-18 при пациентите с исхемична увреда като причина за обостряне на ХБЗ са значимо по-високи в сравнение с тези при пациентите с хроничен тубулоинтерстициален нефрит, като различията са на границата на статистическата достоверност, ( $p_{\text{хроничен тубулоинтерстициален нефрит}}=0,052$ ;  $p_{\text{исхемия}}=0,052$ ).

Значими разлики при sIL-18 се наблюдават при сравнение между пациентите със системен васкулит в непълна ремисия и исхемична увреда, спрямо другите нозологични групи. При пациентите с тези

две заболявания са налице по-високи нива на маркера, които достигат статистическа значимост, ( $p_{\text{системен васкулит в непълна ремисия}}=0,026$ ;  $p_{\text{исхемия}}=0,026$ ).

От проведеното сравнение на средните стойности на останалите показатели с непараметрично разпределение uKIM-1 и uNAG с тест на Kruskal-Wallis и Independent Median test не се установяват сигнификантни различия при отделените патофизиологични групи.

При сравнение на средните стойности на параметрично разпределените показатели sNGAL и sCysC между различните нозологични групи няма съществени различия.

## ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от нашето изследване допринасят за надграждане и обогатяване на теоретично-практическите аспекти при такъв клинично значим проблем като ОБУ и изострено ХБЗ.

Налице са аналитични затруднения свързани с всеки специфичен БМ. От друга страна няма единно мнение по отношение на референтен показател, спрямо който биомаркерите да бъдат оценявани. Понастоящем Scr се използва като стандарт за клиничната оценка на тези биомаркери [148]. Наскоро приключили проучвания установиха голям брой нови биомаркери в серум и урина, които могат да предвидят изявата и прогресията на ОБУ. Те са в различни етапи на развитие валидизация. [9-12]

sCysC се счита по-скоро за и маркер за БФ, отколкото за тубулна увреда. Не зависи от извънбъбречни фактори и придружаваща чернодробна патология. При повишаване на нивото му с над 10%, той е независим предиктор за неблагоприятно голямо събитие като смърт или заместителна терапия през първата година след изявата на ОБУ [47]. Повишената концентрация на CysC в серума при пациенти с ОБУ е белег за неблагоприятно развитие на заболяването и налага започването на бъбречно заместителна терапия в по-ранна фаза, преди развитие на олигурия.

sNGAL се експресира в бъбречните тубули след токсична, исхемична увреда или след бъбречна трансплантация (БТ) [163, 164, 162]. Веднага след началото на ОБУ m-RNA на NGAL се повишава значително в бримката на Хенле и проксималните тубули и води до повишен синтез и екскреция на NGAL в урината [87,18,19]. Проучванията при хора определят NGAL като биологичен маркер за ранно диагностициране, терапевтично мониториране и прогноза при ОБУ. При възрастни с доказано ОБУ се наблюдава 10-тократно повишаване на концентрацията на NGAL в серума.

sIL-18 е инфламаторен цитокин, който се повишава при ОБУ. Неговата роля в патогенезата на ОБУ е демонстрирана в експериментални животински модели с исхемично-реперфузионна увреда. При тях е доказано, че потискането на неговата синтеза предпазва бъбрека от увреждане [157]. От всички цитокини IL-18 е

смятан за най-подходящ при диагностицирането на ОБУ [203,168, 41].

uKIM-1 е трансмембранен гликопротеин, който се синтезира в проксималния тубул и се освобождава в урината при исхемично и нефротоксично увреждане. Поради това се счита, че уринният KIM-1 е по-чувствителен и специфичен БМ отколкото SCr. Той не се открива при здрави индивиди. Повишената експресия и усилена синтеза на KIM-1 възниква в зони на тубулоинтерстициални лезии с възпаление и фиброза. Индукцията на KIM-1 нараства при остро настъпила лезия и при значима протеинурия. KIM-1 е обещаващ, сензитивен и специфичен маркер за ОБУ при хора. На практика маркерът остава непроменен от физичните и химичните качества на урината и нейните компоненти.

NAG се откриват в урината във високи концентрации при увреждане на тубулните клетки в резултат на нефротоксични агенти (лекарства, контрастна материя, тежки метали), както и при диабетна нефропатия, обструктивна уропатия, отхвърляне на алографта, артериална хипертония (АХ). Повишаването му е ранен признак на тубулно засягане. Уринният NAG е ценен за оценка на гломерулната функция при диагностициране на ХБЗ [102]. За разлика от другите уринни ензими, които се филтрират през гломерула, повишените концентрации на NAG в урината отразяват тубулна дисфункция [171].

Основните акценти в обсъждането на резултатите могат да се групират в следните пет направления:

I. Оценка на петте БМ за диагностициране на ОБУ и изострено ХБЗ с хетерогенна етиология, както и тяхната специфичност и чувствителност.

**В групата с ОБУ** всички изследвани БМ показват много добра диагностична способност. Най-демонстративно се отличава uKIM-1, който е завишен при всички пациенти с ОБУ. Тези резултати се подкрепят от редица клинични изпитвания. При проучване сред пациенти с ОБУ нивата на uKIM-1 са значително завишени, в сравнение със здравите контроли [250].

В нашето изследване sCysC се представя много убедително. Маркерът се позитивира между 6-ти и 24-ти час при 98.5% от болните спрямо здравите контроли. По литературни данни серумните нива на CysC могат да бъдат използвани за регистриране на бъбречна дисфункция при пациенти с ОБУ в първите 24-48 часа [244, 60].

В нашето проучване sNGAL се позитивира значимо при 88.2% от пациентите с ОБУ в сравнение със здравите контроли. След обработване на резултатите, и при двете групи лица се получи статистически значими разлики за sNGAL с очаквано по-високи стойности при болните. Mori et al 2005 са провели срезово проучване с изследване на серумен и уринен NGAL при пациенти с известна ОБУ. Техните резултати показват маркантно завишаване стойностите и на двете форми на NGAL в сравнение със здравите контроли [169]. Скорошни студии предлагат NGAL като надежден диагностичен и прогностичен маркер за ОБУ [68,248,89]. ADQI-Guidelines препоръчват използването на NGAL при пациенти със suspectен ОБУ синдром като ранен, надежден, изпитан маркер за бъбречна увреда [210]. Диагностичната способност на NGAL сигнификантно се подобрява, когато се изследва едновременно с uKIM-1 и uNAG(AUC 0,780) [92]. Има нужда от по-големи клинични изследвания, които прецизно да дефинират референтните граници на двете форми на NGAL, коректната интерпретация в техните отклонения, както и да потвърдят, че NGAL е тропонина на бъбрека [68]. В настоящия труд предлагаме комбинацията uKIM-1 и uNAG като панел за повишаване на диагностичната надеждност при изострено ХБЗ.

В нашето изследване sIL-18 е завишен при 60.3% в групата с ОБУ в сравнение със здравите доброволци. Подобни са резултатите от срезово проучване на Parikh CR et al 2004, включващо 72 пациенти, при които IL-18, е сигнификантно по-висок при пациентите с ОБУ спрямо здравите контроли [190]. Doi K et al 2012 публикуват резултати от проспективно проучване при кохорта от 337 пациенти. Болните са били с ОБУ и транзиторна ОБУ (възстановяване на бъбречната функция до 48 ч) с различна етиология. Поради тежко увредено състояние те са лекувани в отделение за интензивни



грижи. IL-18, както и останалите оценявани БМ (NGAL, NAG, L-FABP) показват сигнификантно повишени нива в двете групи болни в сравнение с болни без ОБУ [75].

В проучването ни uNAG се позитивира само в 44.1% от пациентите с ОБУ в сравнение със здравите контроли. Този резултат е неочакван за нас, предвид литературните данни, че uNAG е високо чувствителен за диагностицирането на ОБУ [75]. При активна бъбречна болест нивата на NAG в урината остават трайно високи.

Измерването на петте проучвани показателя в серум и урина в първите 24 часа от регистриране на увреждането, показват много висока специфичност и чувствителност по отношение диагностицирането на ОБУ.

Проведеното от нас изследване установи висока AUC на биопараметрите при изчисляване на съотношенията спрямо Scr. ROC-анализът показва AUC за sCysC/Scr 0.85 ( $p < 0.001$ ), за uKIM-1/Scr 0.84 ( $p < 0.001$ ), за sNGAL/Scr 0.79 ( $p < 0.001$ ), за sIL-18/Scr 0.74 ( $p < 0.001$ ) и за NAG/Scr 0.71 ( $p < 0.001$ ).

Нашето наблюдение демонстрира много висока AUC на маркерите при изчислените съотношения спрямо GFR при болните с ОБУ. ROC-анализът разкри AUC за uKIM-1/GFR 1.00 ( $p < 0.001$ ), за sCysC/GFR 0.99 ( $p < 0.001$ ), за sNGAL/GFR 0.93 ( $p < 0.001$ ), за sIL-18/GFR 0.80 ( $p < 0.001$ ) и за NAG/GFR 0.72 ( $p < 0.001$ ).

При всички болни с **изострено ХБЗ** в нашето проучване uKIM-1 е висок. Експериментални студии предполагат, че uKIM-1 може да е индикатор за преминаване на ОБУ в ХБЗ. Изискват се допълнителни проучвания, обхващащи по-голяма популация пациенти, за оценка на uKIM-1 като маркер за ХБЗ [128].

При 96.9% от пациентите с изострено ХБЗ sCysC е с много високи стойности, спрямо здравите доброволци. Много от маркерите, използвани за диагностициране на ОБУ, могат да бъдат приложени и за диагностиката на изострено ХБЗ. В литературата най-често предлаганите за тази цел БМ са CysC и NGAL [39,272].

В настоящия дисертационен труд прави впечатление, че sNGAL е завишен при значителна част от болните с изострено ХБЗ (68.8%).

Има много литературни данни за NGAL като маркер за ХБЗ и неговата тежест [38]. Пациенти, чакащи БТ и подлежащи на хронично ХД лечение имат сигнификантно по-високи нива на NGAL спрямо здравите контроли.

При настоящето изследване маркерът е по-силно показателен в групата с ОБУ. Wagener G et al 2008 установяват, че при мониториране нивата на NGAL е налице ясна тенденция за понижаване стойностите му на 3-ия, 18-ия и 24-ия час при пациенти с ОБУ [258].

При sIL-18 се отчита значимо завишаване на нивото му в групата с изострено ХБЗ. Luk CC et al 2013 също намират по-високи стойности на IL-18 при 39 пациенти с изострено ХБЗ [147].

Нивото на NAG в урината показва значимо нарастване при болните с изострено ХБЗ. Маркерът е завишен при 59.4% от болните в тази група, за разлика от пациентите с ОБУ, където този процент е по-нисък-44.5%. Продължават лонгитудинални проучвания за оценката на uNAG като маркер за ХБЗ.

При пациентската популация с изострено ХБЗ всички БМ са значимо повишаване над референтните стойности. Открояват се uKIM-1 и sCysC, които се позитивират в цялата група.

Оценката на петте БМ до 24-ия час от установяване на увреждането разкрива висока специфичност и чувствителност по отношение диагностицирането на изострено ХБЗ.

Проведеното от нас изследване установи много висока AUC на биопараметрите при изчисляване на съотношенията спрямо Scr при болните изострено ХБЗ. ROC-анализът показва AUC за uKIM-1/Scr 0.94 ( $p < 0.001$ ), за sCysC/Scr 0.92 ( $p < 0.001$ ), за sNGAL/Scr 0.86 ( $p < 0.001$ ), за NAG/Scr 0.78 ( $p < 0.001$ ) и за sIL-18/Scr 0.76 ( $p < 0.001$ ).

Резултатите демонстрират много висока AUC на маркерите при изчислените съотношения спрямо GFR при пациентите с изострено ХБЗ. ROC-анализът разкри AUC за uKIM-1/GFR 1.00 ( $p < 0.001$ ), за sCysC/GFR 0.98 ( $p < 0.001$ ), за sNGAL/GFR 0.86 ( $p < 0.001$ ), за sIL-18/GFR 0.80 ( $p < 0.001$ ) и за NAG/ GFR 0.80 ( $p < 0.001$ ).

Проучването се проведе сред неголеми пациентски групи: ОБУ (n=68) и изострено ХБЗ (n=32). Установява се, че диагностична стойност на uKIM-1/Scr (AUC=0.94) е по-голяма при изострено ХБЗ. Тя е близка до отличната, позволява разграничаването на изострено ХБЗ от ОБУ-синдрома. sNGAL/GFR демонстрира много добра, близка до отличната диагностична стойност (AUC=0.933) в групата с ОБУ, докато uNAG/Scr и uNAG/GFR показват много по-добра диагностична стойност при изострено ХБЗ.

Всеки един от изследваните БМ, измерен в съотношение със Scr и GFR, демонстрира много добра диагностична стойност, както по отношение на ОБУ, така и при изострено ХБЗ. Това налага търсене на оптимални комбинации от БМ, които с голяма точност да да разграничат ОБУ от изострено ХБЗ, рано да диагностицират ОБУ и да предвидят прогресията на заболяването към краен стадий на бъбречно увреждане.

II. В настоящия труд се оцениха промените в нивата на БМ в зависимост от продължителността на изострено ХБЗ. За целта пациентската популация беше разделена на две групи: с продължителност на предшестващото ХБЗ до две години и болни с над три годишна давност. Всички маркери демонстрират високи стойности. Резултатите установиха, че нито един от петте БМ не показва специфична динамика в зависимост от продължителността на ХБЗ.

Резултатите ни показват значими разлики в нивото на sCysC при всеки един от стадията. sNGAL и uNAG демонстрират различия при сравняване на 1-ви с 2-ри и 1-ви с 3-ти стадия. Силно впечатление прави нарастването на стойностите на sCysC и sNGAL пропорционално на стадия. В проучените от нас литературни източници не открихме публикации свързани с такива резултати. За sIL-18 и uKIM-1 не се отчитат различия в нивата им в зависимост от стадия на изострено ХБЗ.

sNGAL корелира със степента на бъбречното засягане при пациенти с ХБЗ, независимо от основната причина, довела до бъбречна дисфункция [54].

Luk CC et al 2013 при проучване върху 39 пациенти с хронична бъбречна недостатъчност демонстрират корелация между нивата на NGAL и тежестта на бъбречната недостатъчност [147].

Bolignano et al 2008 са оценили 69 пациенти с различна по степен и етиология ХБЗ. Изследван е серумен и уринен NGAL. Авторите коментират възможността sNGAL да предвиди прогресията на ХБЗ. Това го прави ценен маркер за терапевтичния отговор при различни бъбречни заболявания [38].

Резултатите от метаанализ, направен от Ronco et al 2014, разкриват отличната способност на sNGAL за предвиждане прогресията на ХБЗ в определени популации пациенти [207]. Две проучвания на Bolignano 2008 и 2009 г демонстрират близката зависимост между NGAL и степента на бъбречното увреждане, която се потвърждава в кохорта от пациенти с ХБЗ [35, 40].

Коментира се идеята за връзка между sNGAL и редуцираната БФ. Счита се, че тази връзка е постоянна във времето и паралелна на прогресията на ХБЗ [36,37,133].

Много от маркерите използвани за диагностициране на ОБУ могат да бъдат приложени и за диагностика и прогресия на ХБЗ. Такъв БМ е NGAL. Bolignano D et al 2008 намират при 96 пациенти с различна етиология на ХБЗ, че sNGAL предсказва прогресията на ХБЗ независимо от динамичните промени в GFR и възрастта. Пациентите не са били в краен стадий на бъбречно увреждане. Резултатите на авторския колектив са, че sNGAL отразява реалното бъбречно увреждане и представлява силен и независим маркер за прогресията на ХБЗ [39].

III. Анализира се връзката между биопараметрите със Scr и креатининов клирънс при болните с ОБУ и тези с ХБЗ. Установяват се редица зависимости и при двете групи болни.

✓ При пациентите с ОБУ

- Връзка между биопараметрите и Scr.

Установява се значима зависимост между Scr със sCysC и със sNGAL, както и умерена такава със sIL-18. Скорешни лонгитудинални проучвания сочат, че индивидуалните вариации на sCysC са близки до тези на SCr. Това прави sCysC по-акуратен от

SCr при тези дългосрочни проследявания [205]. sCysC е предложен от Dharnidharka 2002 и Grubb 2005 като алтернативен БМ за оценка на БФ поради неговите приемливи предимства пред SCr [70,86]. Две проучвания на Dharnidharka 2002 и Grubb 2005 оценяват sNGAL като БМ за ОБУ. И двата колектива отчитат наличие на директна корелация на показателя със стойностите на SCr [70,86]. В проучването на Mori et al 2011 се демонстрира връзката между нивата на sNGAL и uNGAL със Scr и eGFR [169]. Нашите резултати също потвърждават, че този показател е много чувствителен за установено ОБУ.

Ние установяваме умерена положителна връзка между Scr и sIL-18. Parikh CR et al 2004 в проучване с 33 пациенти претърпели кардиопулмонален байпас с повишен Scr  $\geq 50\%$  намират корелация между IL-18 и Scr [190].

- Връзка между биопараметрите и eGFR.

Намира се значима зависимост между двата БМ-sCysC и sNGAL с eGFR. Маркерите демонстрират силна отрицателна връзка с показателя. Цитираните по-горе авторски колектива (Dharnidharka 2002 и Grubb 2005) намират силна обратна връзка на sNGAL с изчислената GFR (sNGAL/Cr R= -0.90, p=0.007) [70,86].

Другият маркер, който корелира в умерена степен с eGFR, е IL-18. Не открихме данни за подобна корелация в проучените от нас литературни източници.

- При пациентите с изострено ХБЗ
- Връзка между биопараметрите и Scr.

Степента на корелация между sCysC със Scr е идентична както в групата с ОБУ. При sNGAL тази връзка е умерена.

Не се установява значима връзка между uKIM-1 и eGFR. В проучване от 2014г. на Sabbisetti V et al не се установява връзка на uKIM-1 със Scr и eGFR, което може да се дължи на по-леко протичащо увреждане. Смята се, че uKIM-1 е маркер за

тубулоинтерстициална увреда “дори при пациенти с лека бъбречна дисфункция и Scr под 180  $\mu\text{mol/l}$ ” [213].

- Връзка между биопараметрите и eGFR

Налице е отрицателна зависимост между eGFR и три от БМ. Голяма е зависимостта му със sCysC. Маркерът е сензитивен при малки промени в GFR. Важен е фактът, че той е по-чувствителен към малките промени в т. нар. ”сляпа“ (GFR 40-70 ml/min) креатининова зона [220]. Използването на комбинацията sCysC със SCr за изчисляване на GFR повишава нейната достоверност за оценка на ХБЗ [226]. В нашето изследване се намира значителна зависимост между sNGAL и eGFR. Mori and Nagaо 2007 предлагат интересно алтернативно обяснение за значението на корелациите между биологичните нива на sNGAL и показателите за БФ, развивайки т.нар. Forest Fire Theory. Според нея повишаването на sNGAL при ХБЗ е сравнено с горски пожар и е резултат на активирането на постоянна продукция от резидуалните жизнеспособни тубулни клетки, които са “запалени“ от съпътстващата бъбречна болест. Налице е функционална загуба на тубули и нефрони, без да е настъпило сигнификантно намаляване на GFR и повишаване на SCr. Продукцията на sNGAL от тубулните клетки е индикатор в “реално време “ колко голяма е увредата и колко активно е заболяването, причинило хроничното бъбречно нарушение [170].

Умерена е връзката между uNAG и eGFR. Ние не намерихме данни за подобна връзка в проучената от нас литература.

IV. Установиха се важни корелационни връзки между отделните БМ и се намериха зависимости между тях с клинични и лабораторни параметри.

- ✓ Зависимости между БМ помежду им

- При пациентите с ОБУ

Намираме корелация на sCysC, sNGAL, sIL-18 и uNAG по между им. Отбелязва се умерена връзка между sCysC и sIL-18. Налице е умерена обратна корелация на sCysC с sNGAL. Papassotiriou GP et al 2016 установяват силна корелационна връзка между sCysC и sNGAL при пациенти с остра миеломна нефропатия [187]. Установява се слаба връзка между sCysC и NAG. Нашите резултати се потвърждават по отношение на корелацията между

sCysC и uNAG от изследване на Benzer M et al 2016. Авторите са изследвали деца с контраст-индуцирано ОБУ, където установяват слаба връзка между sCysC и uNAG [29].

В проучената от нас медицинска литература не открихме данни, потвърждаващи установената от нас корелационна връзка между sCysC и sIL-18.

- При пациентите с изострено ХБЗ

sCysC разкрива значима положителна корелация със sNGAL и uNAG. Тук, за разлика от групата с ОБУ, маркерът не показва зависимост с sIL-18.

✓ Зависимост на биомаркерите с клинични параметри

- При пациентите с ОБУ:

С помощта на корелационен анализ се установява умерена корелация между възрастта и нивата на sCysC и uNAG в първите 24 часа от увреждането при пациентите с ОБУ.

В настоящето проучване sCysC демонстрира умерена отрицателна зависимост с диурезата. Връзката на sNGAL с този параметър е положителна. Не открихме литературни източници оценяващи изследваните от нас корелационни връзки.

- При пациентите с изострено ХБЗ:

С помощта на корелационен анализ се установява умерена отрицателна степен на корелация между възрастта и измерените нива на uNAG в първите 24 часа от настъпване на увредата при пациентите с изострено ХБЗ. Не намерихме литературни данни описващи подобни корелационни зависимости.

✓ Зависимост на биомаркерите с други лабораторни показатели

- При пациентите с ОБУ

В настоящето изследване се установява значима зависимост на sCysC с урея. Нашите резултати са подобни на данните от проучване на Shu Chen et al 2015, които са намерили сигнификантна корелация между sCysC и урея при 57 болни с ОБУ след травматичен шок [55]. uNAG и sCysC демонстрират умерена

връзка с пикочната киселина. В проучените литературни източници не намерихме зависимости, подобни на установените от нас.

- При пациентите с изострено ХБЗ

Уреята демонстрира значителна зависимост със sCysC и sNGAL. От направената справка не намираме данни по отношение на установената от нас зависимост.

V. Оценки се различават в нивата на БМ при пациенти с ОБУ и изострено ХБЗ в резултат на различни причини за бъбречна увреда.

✓ При пациенти с различни причини за развитието на ОБУ Отбелязват се значими разлики в нивата на sNGAL и sCysC между отделните нозологични групи. Очаквано най-високи стойности на двата серумни показателя се регистрират в групите със съпътстваща есенциална хипертония и остър тубулоинтерстициален нефрит, исхемично ОБУ и първични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром. Тези резултати се потвърждават от литературни данни, сочещи че sNGAL се експресира в бъбречните тубули след токсична или исхемична увреда [163,164,165]. NGAL се приема като маркер и за гломерулна патология поради токсичния ефект, който протеинуиата оказва върху тубулните клетки. По-високите стойности на sNGAL при болните с остър тубулоинтерстициален нефрит като причина за ОБУ, може да се обяснят и от скорошни проучвания, които свързват маркера с възпалителен процес на тубулоинтерстициалния апарат на бъбреците. През 2011 Tadesse et al регистрират повишена експресия на NGAL след като бъбречните структури са били изложени на медиатори на възпалението [236].

Вероятно намерените при нас несигнификантно повишени стойности на NGAL и CysC при пациентите с остра миеломна нефропатия и остра медикаментозна нефропатия, могат да се обяснят с по-малкия брой болни в тези групи.

Проучването установява вариации в стойностите на uNAG между отделните патофизиологични групи. Маркерът се представя с най-високи стойности в групите с остра миеломна нефропатия и остра



медикаментозна нефропатия като причини за възникване на ОБУ. Тези резултати се подкрепят от литературни източници, в които се потвърждава, че високи уринни концентрации на NAG се установяват след увреждане на тубулните клетки както от нефротоксични агенти [102], така и от кумулация на леки вериги. Ние установяваме, че uNAG има високи стойности при ОБУ, възникнало в резултат на гломерулно засягане или васкулит. Сходни данни са получили Hultberg B et al при проучване на 109 болни с различни форми на гломерулонефрит, при които uNAG демонстрира висока уринна концентрация. Изследователите изказват хипотезата, че този резултат вероятно е свързан с абнормен транспорт на протеини, които причиняват тубулна токсичност [110].

В настоящето изследване не се регистрират повишени нива на uNAG при пациентите остър тубулоинтерстициален нефрит и исхемично ОБУ.

Внимание заслужава факта, че при никой от бъбречно трансплантираните пациенти в проучването ни, не се установяват високи уринни нива на NAG. Kwiatkowska et al 2014 счита, че uNAG може да се използва като БМ за исхемично-реперфузионно увреждане на графта, асоцииращо се с по-бързо протичаща хронична дисфункция [134].

Възможно обяснение за нормалните нива на uNAG при нашите пациенти претърпяли БТ е добрият ефект от провежданото комплексно лечение на тази специфична популация.

При нас sIL-18 не показва значими различия в отделните патофизиологични групи при ОБУ. Обратно, в няколко литературни източника се застъпва тезата, че той може да се използва като маркер за разграничаване причината довела до остро влошаване, тъй като серумните му нива не се повлияват от съществуваща преренална азотемия, ХБЗ, уринарни инфекции или нефрозен синдром [254, 189, 261].

✓ При пациенти с различни причини за изострено ХБЗ.

Крайно неочакван за нас е резултатът, че при пациентите с изострено ХБЗ единствено sIL-18 демонстрира сигнификантни разлики при две от нозологичните групи. Той е най-висок при болните със системен васкулит в непълна ремисия и исхемично ОБУ с предшестващо ХБЗ. Свързваме този резултат с факта, че имунният отговор играе ключова роля в патогенезата на двете състояния чрез продукцията на проинфламаторни цитокини и хемокини [269].

В групата с изострено ХБЗ в нашето изследването, uNAG има значимо по-високи стойности при болните с първични гломерулни болести с рецидив, протичащи с влошена бъбречна функция. По-високи стойности на показателя се отбелязват и при пациентите с хроничен тубулоинтерстициален нефрит като причина за изостряне на съществуващото ХБЗ. Вероятно обяснение на тези резултати са напреднали тубулни увреждания с изява на по-висока протеинурия, както и по-голямата загуба на нефрони.

Поради малкия брой пациенти във всяка от патофизиологичните групи не могат да се отчетат статистически значими разлики в стойностите на uNAG, както за пациентите с ОБУ, така и за болните с изострено ХБЗ.

Стойностите на uKIM-1 са значимо високи във всички изследвани патофизиологични групи както при ОБУ, така и при изострено ХБЗ. На базата на отчетените резултати в нашето проучване, ние имаме основание да приемем, че uKIM-1 не показва специфичност в разграничаването на различни патофизиологични състояния.

## ИЗВОДИ:

1. uKIM-1 и sCysC се отличават с максимална чувствителност и специфичност като маркери както за ОБУ, така и за изострено ХБЗ.
  - за повишаване диагностичната надеждност при ОБУ може да се предложи панел: sCysC+sNGAL или uKIM-1 +sNGAL;
  - при изострено ХБЗ се откроява и uNAG. За повишаване на диагностичната надеждност при изострено ХБЗ може да се предложи панел на uKIM-1 + uNAG или sCysC +uNAG.
2. От петте БМ sCysC е най-надежден за разграничаване на всеки от стадията на изострено ХБЗ, а sNGAL и uNAG са надеждни при разграничаването на лека от умерена степен на изострено ХБЗ.
3. sCysC корелира със стойностите на Scr и eGFR при ОБУ и изострено ХБЗ, а sNGAL показва такава корелация само при групата с изострено ХБЗ.
4. Биомаркерът, който демонстрира най-значима надеждност при ОБУ е sCysC поради корелацията му с останалите БМ, Scr, eGFR и лабораторни параметри.
5. sCysC и sNGAL се открояват с най-значимо нарастване при остър тубулоинтерстициален нефрит със съпътстваща есенциална хипертония, първични хронични гломерулни болести с първа изява на остър нефритен синдром и исхемично ОБУ;
  - sIL-18 е единственият биомаркер при изострено ХБЗ, който е сигнификантно повишен в различните патофизиологични групи.

## **ПРИНОСИ:**

### Научно-теоретични

- Направена е оценка на диагностичната надеждност на петте БМ при ОБУ и изострено ХБЗ с хетерогенна етиология, но нехарактерна за отделенията за интензивни грижи за първи път в нашата страна.
- Два от изследваните БМ- sCysC и uKIM-1 показват предимство както при ОБУ, така и при изострено ХБЗ.

### Научно-приложни

- Предлагат се диагностични панели за ОБУ и изострено ХБЗ.
- Установява се липса на зависимост между нивата на изследваните БМ с прилаганите медикаментозни средства (антихипертензива, диуретици, НСПВС, инхибитори на ксантинооксидазата, АБ, КС, цитостатици) и при двете групи болни.

Аз, долуподписаният (ната): \_\_\_\_\_ СЪМ  
съгласен(на) да

име на участника в изследването

участвам в изследване за определяне на серумни и уринни биологични маркери при ранна бъбречна увреда.

**ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ**  
**ЗА УЧАСТИЕ В ИЗСЛЕДВАНЕ НА**  
**СЕРУМНИ И УРИННИ БИОЛГИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ ОСТРА БЪБРЕЧНА**  
**УВРЕДА**

**Информиран(а) съм, че:**

▪ Участието ми в настоящето изследване е напълно **ДОБРОВОЛНО** и **съгласието или отказът ми да участвам в него, по никакъв начин няма да повлияе на лечението ми.** Имам право да прекратя участието си в това изследване по всяко време, като изразя писмено желанието си за това пред лекуващия лекар или водещия изследовател на настоящият проект. При необходимост от допълнителна информация за проекта и моите права като участник в него, мога да се обърна към гореспоменатите.

▪ Приемайки да участвам в това изследване, аз давам съгласието си да ми бъде взета около 20 мл кръв и 50 мл урина по начина, по който това се прави при всички медицински изследвания на кръвта в Р. България и съм наясно, че рискът от тези манипулации не е по-висок от среднестатистическия за медицинските заведения в страната. В някои случаи материалът за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава може да е необходимо отново да дам кръв и урина. Ако това се случи, запазвам правото си да откажа и приемам, че в резултат на отказа ми, имунологичният анализ в моя случай може би няма да бъде проведен до край.

▪ Кръвта и урината ще се използват за определяне както на рутинни лабораторни показатели, така и за имунохимично изследване. Пробите ще бъдат обозначени с код, което ще осигури моята анонимност. Информацията за мен ще бъде достъпна само на насочващия ме лекар и оторизираните членове на изследователския екип, които носят отговорност за запазване на моята анонимност.

▪ С настоящето давам съгласие за участието си в научно-изследователски проект. В качеството си на научна разработка, настоящето изследване може да не доведе до резултати, които да бъдат от пряка полза за диагностиката и/или лечението ми, но ще помогне за изясняване на молекулните основи на

заболяването, което в бъдеще може да доведе до разработване на нови подходи за диагностиката и/или лечението му.

▪ След приключване на изследванията, част от моите проби ще се съхранява в хладилник при  $-20/-80^{\circ}$  в Клиника по нефрология. Централната клинична лаборатория може да повтори анализите в бъдеще чрез нови, разширени или подобрени методи с остатъка от пробите, ако това е необходимо и възможно.

**В случай, че получените резултати имат отношение към диагностиката или лечението на моето заболяване, желая те да ми бъдат съобщени лично, чрез насочващия ме лекар. Резултатите ми са поверителни и могат да бъдат съобщавани на други лица само след моето писмено съгласие.**

Получих копие от това съгласие:

Дата: \_\_\_\_\_

Подпис: \_\_\_\_\_

*Обясних същността на изследването на горепосочения(ната) и отговорих на всички зададени въпроси.*

Име: \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_ Подпис

## ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПАЦИЕНТА

### **СЕРУМНИ И УРИННИ БИОЛОГИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ ОСТРА БЪБРЕЧНА УВРЕДА**

#### **ПАТОФИЗИОЛГИЧНА ПЕРСПЕКТИВА**

**Уважаема госпожо / господине /,**

Предлагаме Ви да участвате в клинично изследване, изучаващо острото бъбречно увреждане и най-честото/тежкото му усложнение- крайна бъбречна увреда. Моля отделете време да прочетете последващата информация внимателно. Задайте въпроси ако нещо не Ви е ясно или желаете да получите повече информация. Участието в изследването е напълно доброволно и ако решите, че искате да участвате трябва да удостоверите съгласието чрез подпис на бланка за информирано съгласие.

Клиничното изследване, в което сте поканен/а да участвате изучава увредата на бъбречната структура и функция при остра бъбречно увреждане и значението на различни групи методики за поставяне на максимално точна и своевременно диагноза на острата бъбречна увреда. Данните от това изследване ще послужат за основа за бъдещи проучвания на различни средства за терапия и предотвратяване на инвалидизирането на пациенти с остри бъбречни заболявания. Изследването е иновативно по рода си в Р. България, защото включва специфична методика за диагноза на ранната увреда на бъбречната структура и функция.

**Изследването е с продължителност една година.**

През това време Вие ще бъдете подложени на набор от изследвания, чиято цел е установяване на потенциална увреда на различни бъбречни структури, имащи отношение към бъбречната функция. Изследователите, отговорни за проекта биха желали да проведат манипулации, свързани с взимане на кръвни и уринни проби, които са от основно значение за установяване на увреда на основната структурно-функционална единица на бъбрека /гломерул/, отговорна за почистваща функция на

кръвта. Чрез тези манипулации бихме могли задълбочено да разберем каква част от гломерула е засегната се увреждат впоследствие на заболяването, ще дадем предложение за изработване на алгоритъм за ранна диагноза на остра бъбречна увреда.

### **Какво е остра бъбречна увреда**

Острата бъбречна увреда (ОБУ), наричана преди остра бъбречна недостатъчност (ОБН), е често срещан комплексен клиничен синдром с различна етиология, при тежко болни пациенти и е свързана с висока смъртност. Тя се дефинира като внезапна и продължителна загуба на бъбречна функция, причиняваща постоянна акумулация на азотни и неазот-съдържащи продукти и токсинни, с бързо развитие на водно-електролитни и алкално-киселинни нарушения. Честота на развитие и смъртност са високи, което налага непрекъснато търсене на ефективни терапевтични подходи. Честотата на възникване на ОБУ варира от 5 % при стационарите до 30-50% в сектора за интензивни грижи.

Разрушителният ход на ОБУ обяснява нарастващия интерес на клиницистите за намирането на ефективна защита срещу последствията от заболяването, базирани върху ранното увреждане и регистриране и оценка на клиничното протичане и прогноза, позволяващо провеждане на ефективно лечение.

### **Цел на изследването**

Да се докаже диагностичната стойност на различни биологични маркери (биомаркери) в серум и урина при пациенти с остри бъбречни заболявания (ОБЗ), оценявайки ранната бъбречна увреда и прогнозиране към хронична бъбречна увреда (ХБУ);

### **Дизайн на изследването**

За да участвате в изследването, Вие трябва да имате желание да се подложите на три групи от изследвания, които ще се провеждат на определени интервали от време. Първата група изследвания ще включва подробен физикален статус. Втората група изследвания са ехографски и се извършват с помощта на апарат, наречен ултразвуков ехографски, пробите се изпълняват бързо и не са неприятни за пациента. Третата група тестове ще включва изследване на кръвна картина, биохимия и вземане на кръв и урина за специализираните лабораторни изследвания. Те ще се провеждат сутрин и ще се взимат на гладно. Трета и последна група изследвания са от особена важност за проучването и предвижда вземането на 20 мл кръв и 50 мл урина, които ще се вземат след подписано специализирано информирано съгласие



## **Критерии за включване**

Лица с клинично-лабораторни данни за остра бъбречна увреда и здрави контроли, само след подписана бланка за информирано съгласие.

## **Критерии за изключвани**

Лица от 0-17г, бременни жени, затворници и пациенти с психични заболявания, с умствено изоставане, с деменция, лица със зависимости. Не се включват лица, прекарвали остър инфаркт на миокарда или исхемичен/ хеморагичен мозъчен инсулт в рамките на 30 дни до деня на даване на информираното съгласие.

## **Етапи на изследването**

Изследването се състои от пет етапа, като три от тях са свързани с провеждане на клинични и лабораторни изследвания, а последните два - на статистическа обработка на получените данните и изнасяне на резултатите.

**Клиничния статус** се състои в обстоен преглед с акцент върху бъбреците. Измерване на артериалното налягане с анероиден сфингоманометър. На всички участници ще се измерва ръст [см], телесно тегло [кг], на базата на които ще се изчислява индекса на телесната маса (BMI) [kg/m<sup>2</sup>] и креатининовия клирънс по формулата на Cockcroft-Gault в [ml/min].

**Ехографските методи** на изследване не причинява негативни усещания на пациента и се провежда лесно. Апаратите, наречени ултразвукови ехографи, функционират чрез ултразвукови вълни, които са напълно безвредни за пациента и при съдействие от негова страна се провеждат бързо и изискват минимална предварителна подготовка от негова страна.

**Клинично-лабораторното изследване** се състои в двукратно взимане на 10 ml венозна кръв сутрин на гладно за изследване на пълна кръвна картина, коагулационен статус, биохимични показатели и кръв за специализираните лабораторни изследвания в два последователни дни. В редки случаи може да има кръвене, оток, зачервяване, възпаление, болка или локална инфекция на мястото на убождане, но този риск е минимален, тъй като ще бъде използван обучен персонал. На втория ден ще се събират и уринните проби. На всички участници ще се събират 2 уринни проби сутрин след сън, ако пациентът е с поставен катетър, уринната проба се взима от уринаторната торбичка. Общото количество урина необходимо за изследването е 50 мл. Не се предвиждат усложнения по време на вземането на уринните проби.

## **Етични аспекти**

Вашите кръвни и уринни проби, няма да бъдат обозначени с името Ви, а само с индификационен номер, уникален за всяка проба. Вашето име, адрес или други данни няма да бъдат обозначени на пробите. Данните от всички изследвания ще бъдат съхранени за срок от 5 години в електронна база данни, собствена на Водещия изследовател и ще бъдат защитени от парола, известна само на него. Писмената документация ще бъде съхранена в собствен архив на Водещия изследовател, базиран на територията на УМБАЛ "Александровска" ЕАД, за срок от 5 години. По време и след проучването достъп до данните ще има само изследователския екип. Пациентът има право да се откаже от участие в проучването по всяко време, при условие че уведоми член на изследователския екип. След изказване на желание за прекратяване на участието, резултатите от кръвните, уринните и инструментални изследвания ще бъдат заличени от базата данни на архива на проучването и няма да участват в статистическата обработка на данните. Впоследствие това няма да промени отношението на лекуващия екип и качеството на медицинското обслужване в УМБАЛ "Александровска" ЕАД. Вашите данни ще бъдат използвани само с изследователски цели.

Вашите данни няма да бъдат предоставяни на работодатели, застрахователни компании или на обществото. Резултатите от проведените изследвания, извършени в проучването могат да бъдат публикувани по всяко време. Резултатите може да бъдат представени на научни форуми. Това няма да разкрие Вашите лични данни.

**Благодарим за отделеното време!**

**Лице за контакти:** д-р Владислава Миленова Тодорова

Клиника по нефрология, УМБАЛ "Александровска" ЕАД

гр. София, бул. "Св. Георги Софийски" № 1, ПК 1431

**Мобилен телефон:** +359 887 004 155

**e-mail:** shalamar@abv.bg

## ДЕКЛАРАЦИЯ НА ДОБРОВОЛЕЦА

Декларирам, че съм съгласен (на) да участвам доброволно в изследване за определяне на серумни и уринни биологични маркери при остра бъбречна увреда. Запознах се подробно с предоставената ми от член на изследователския екип Информация. Член на изследователския екип отговори на всичките ми въпроси.

Запазвам правото си при нужда от допълнителна информация, да се обърна към водещия изследовател или друг член на настоящия проект. Участието ми в настоящето изследване е напълно ДОБРОВОЛНО и съгласието или отказът ми да участвам в него, по никакъв начин няма да повлияе на лечението ми

Име: \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_ Подпис

## Библиография:

1. Андреев Е., Кръстева Р., Богов Б., Андреева М., Рапонджиева А., Бънкова М., Киперова Б. Влиянието на H<sub>2</sub> хистаминовите блокери симетидин и фамотидин върху креатининовия клирънс. Нефрол. Хемодиал. Транспл. 1998, 4 №4, 30-32
2. Андреев Е., Кръстева Р., Богов Б., Киперова Б. Формули за изчисляване на креатининовия клирънс по стойността на серумния креатинин. Валидност при оценката на бъбречната функция. Нефрол. Хемодиал. Транспл., 1999, 5, N1, 9-10.
3. Андреева М., Рапонджиева А., Андреев Е., Бънкова М. Креатининов клирънс със симетидиново обременяване–предимства и ограничения. Нефрология Хемодиализа Трансплантация I, 2-3, 1995, 69-76.
4. Богов Б. Контраст-индуцирана нефропатия. В: Нефрология., п/р Е. Паскалев, 2015. БУЛГАРРЕСУРС, София, 670-675
5. Богов Б. Плазматично-клетъчна дискразия и бъбречно увреждане. Под редакцията на доц. Киперова, Make Arts, 2013, София
6. 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.
7. Киперова Б, Добрева Н. Основни клинични синдроми при гломерулонефритите. В: Нефрология., п/р Е. Паскалев, 2015. БУЛГАРРЕСУРС, София, 229-235
8. Киперова Б, Добрева Н. Основни симптоми при гломерулонефритите. В: Нефрология., п/р Е. Паскалев, 2015. БУЛГАРРЕСУРС, София, 236-241
9. Кундурджиев А. Кардиоренален синдром В: Нефрология., п/р Е. Паскалев, 2015. БУЛГАРРЕСУРС, София, 635-642
10. Мушеков В. Остро бъбречно увреждане. В: Нефрология., п/р Е. Паскалев, 2015. БУЛГАРРЕСУРС, София, 661-670
11. Паскалев Е. Остро бъбречно увреждане. В: Нефрология., п/р Е. Паскалев, 2015. БУЛГАРРЕСУРС, София, 655-661
12. Паскалев Е., Златков Б. Филипов Ж., Цветкова Я. Остро бъбречно увреждане-характеристика, класификация,

- патогенеза, клинична картина, терапевтично поведение 2015; 15:655-661
13. Робева Р., Рушидова Ф. В. Нефротоксични лекарствени средства. В: Нефрология., п/р Е. Паскалев, 2015. БУЛГАРРЕСУРС, София, 962-967
  14. Филипов Ж., Златков Б., Паскалев Е. Реакция на отхвърляне на трансплантата В: Нефрология., п/р Е. Паскалев, 2015. БУЛГАРРЕСУРС, София, 825-834
  15. Христова, Ж. 2015. 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. Централна медицинска библиотека, МУ-София.
  16. Abbink F, Laarma C, Braam K, et al. Beta trace protein is not superior to cystatin C for the estimation of GFR in patients receiving corticosteroids. *Clin Biochem* 2008;41:299e305.
  17. Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, Washburn KK, Jefferson LS, Goldstein SL: Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007; 71: 1028–1035.
  18. Alge JL, Karakala N, Neely BA, SAKInet Investigators, et al. Urinary angiotensinogen and risk of severe AKI. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013a;8:184–93.
  19. Alge JL, Karakala N, Neely BA, SAKInet Investigators, et al. Urinary angiotensinogen predicts adverse outcomes among acute kidney injury patients in the intensive care unit. *Crit Care*. 2013b;17:R69.
  20. Araki S, Haneda M, Koya D et al Predictive impact of elevated serum level of IL-18 for early renal dysfunction in type 2 diabetes: an observational follow-up study April 2007, Volume 50, Issue 4, pp 867–873
  21. Arthur JM, Budisavljevic MN, Janech MG. Biomarkers in glomerular disease. In: *Biomarkers in kidney disease*. Ed. C. L. Edelstein. Elsevire Inc., San Diego, 2011.
  22. Aso Y, Okumura K, Takebayashi K, Wakabayashi S, Inukai T: Relationships of plasma interleukin-18 concentrations to hyperhomocysteinemia and carotid intimal-media wall thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:2622–2627, 2003

23. Bagshaw SM, George C, Dinu I, Bellomo R: A multi-centre evaluation of the RIFLE criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 1203–1210.
24. Bagshaw SM<sup>1</sup>, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Oudemans-van Straaten HM, Ronco C, Kellum JA; Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Septic Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients: Clinical Characteristics and Outcomes *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007 May; 2(3):431-9
25. Bailly V, Zhang Z, Meier W, et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem*, 2002, 277(42) : 39739-39748
26. Basta-Jovanovic G<sup>1</sup>, Bogdanovic Lj, Radunovic M, Prostran M, Naumovic R, Simic-Ogrizovic S, Radojevic-Skodric S Acute Renal Failure - A Serious Complication in Patients After Kidney Transplantation *Curr Med Chem*. 2016;23(19):2012-7
27. Bazzi C , Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Napodano P, Paparella M, D'Amico G (2002) Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2002 Nov;17(11):1890-6.
28. Becherucci F, Mazzinghi B, Ronconi E, Peired A, Lazzeri E, Sagrinati C, Romagnani P, Lasagni L: The role of endothelial progenitor cells in acute kidney injury. *Blood Purif* 2009; 27: 261–270.
29. Benzer M, Alpay H, Baykan O, et al. Serum NGAL, cystatin C and urinary NAG measurements for early diagnosis of contrast-induced nephropathy in children. *Ren Fail* 2016;38(1):27–34.
30. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, Rupprecht HJ: Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation* 106:24 –30, 2002
31. Blaufox MD. Measurement of renal function *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4: 503-504

32. Böhmová R<sup>1</sup>, Viklický O. Renal ischemia--reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome *Folia Microbiol (Praha)*. 2001;46(4):267-76);
33. Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, et al. Reference values for cystatin C serum concentrations in children. *Pediatr Nephrol* 1998;12:125e9.
34. Bolignano D, Coppolino G, Campo S, Aloisi C, Nicocia G, Frisina N, Buemi M: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 414–416.
35. Bolignano D, Coppolino G, Lacquaniti A, Nicocia G, Buemi M. Pathological and prognostic value of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in macroproteinuric patients with worsening renal function. *Kidney Blood Press Res*. 2008c;31:274–9.
36. Bolignano D, Coppolino G, Lombardi L, Buemi M. NGAL: a new missing link between inflammation and uremic anemia? *Ren Fail*. 2009c;31(7):622–3.
37. Bolignano D, Coppolino G, Romeo A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) reflects iron status in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009d;24(11):3398–403.
38. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Campo S, Arena A, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin reflects the severity of renal impairment in subjects affected by chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*. 2008b;31:255–8.
39. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:337e44.
40. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press Res*. 2009b;32 (2):91–8.
41. Bonventre JV: Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers. *Contrib Nephrol* 2007; 156: 213–219.
42. Boratyńska M<sup>1</sup>, Kamińska D, Mazanowska O Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2004 Feb 5;58:1-8);

43. Boratyńska M<sup>1</sup>, Kamińska D, Mazanowska O Prevention and therapy of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation Postepy Hig Med Dosw (Online). 2004 Feb 18;58:9-17
44. Bouglé A, Duranteau J. Pathophysiology of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury: The Role of Global Renal Blood Flow and Renal Vascular Resistance Contrib Nephrol. 2011;174:89-97
45. Bove T, Calabro MG, Landoni G, Aletti G, Marino G, Crescenzi G, Rosica C, Zangrillo A. The incidence and risk of acute renal failure after cardiac surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth 2004;18:442–445.
46. Branten AJW, Mulder TPJ, Peters WHM, Assmann KJM, Wetzels JFM: Urinary excretion of glutathione S transferases alpha and pi in patients with proteinuria: reflection of the site of tubular injury. Nephron 2000; 85: 120–126.
47. Briguori C, Visconti G, Rivera NV, et al. Cystatin C and contrast-induced acute kidney injury. Circulation. 2010;121:2117–22.
48. Brunner HI, Bennett MR, Mina R, Suzuki M, Petri M, Kiani AN, Pendl J, Witte D, Ying J, Rovin BH, Devarajan P non-invasive renal protein biomarkers are associated with histological features of lupus nephritis Arthritis Rheum. 2012 August ; 64(8): 2687–2697
49. Burne-Taney MJ, Yokota N, Rabb H Persistent renal and extrarenal immune changes after severe, ischemic injury. *Kidney Int* 2005 Mar;67(3):1002-9.
50. Burne-Taney MJ<sup>1</sup>, Rabb H. The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury Curr Opin Nephrol Hypertens. 2003 Jan;12(1):85-90
51. Burns KE, Chu MW, Novick RJ, Fox SA, Gallo K, Martin CM, Stitt LW, Heidenheim AP, Myers ML, Moist L. Perioperative N-acetylcysteine to prevent renal dysfunction in high-risk patients undergoing cabg surgery: a randomized controlled trial. J Am Med Assoc 2005;294:342–350
52. Califf RM, Adams KF Jr. Relation between dose of loop diuretics and outcomes in a heart failure population: results of the ESCAPE trial. Eur J Heart Fail 2007;9: 1064–1069.



53. Case J<sup>1</sup>, Khan S, Khalid R, Khan A. Epidemiology of Acute Kidney Injury in the Intensive Care Unit.-Crit Care Res Pract 2013;2013:479730
54. Cernaro V, Bolignano D, Buemi A, et al. Overview of Neutrophil Gelatinase- Associated Lipocalin (NGAL) as a Biomarker in Nephrology 206-224 In: Biomarkers in Kidney Disease. Ed.: Patel VB, Preedy VR. Springer Preference, 2016.
55. Chen S, Shi J-S, Yibulayin X, et al. Cystatin C is a moderate predictor of acute kidney injury in the early stage of traumatic hemorrhagic shock. Exp Ther Med 2015;10(10):237-240.
56. Cheng B<sup>1</sup>, Jin Y<sup>2</sup>, Liu G<sup>2</sup>, Chen Z<sup>3</sup>, Dai H<sup>3</sup>, Liu M<sup>4</sup>. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase as an early marker for acute kidney injury in full-term newborns with neonatal hyperbilirubinemia Dis Markers. 2014;2014:315843.
57. 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.
58. Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, Grover F, Daley J. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. Am J Med 1998;104:343–348.
59. Chua HR, Glassford N, Bellomo R. Acute kidney injury after cardiac arrest.-Resuscitation. 2012;83:721-727
60. Coca SG, Yalavarth R, Concato J, Parikh CR: Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: systematic review. Kidney Int 2008; 73: 1008–1016.
61. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR: Long- term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and metaanalysis. Am J Kidney Dis 2009;53:961– 973.
62. Coco TJ, Klasner AE. Drug-induced rhabdomyolysis. Curr Opin Pediatr. 2004;16:206-10.  
complex rescues the kidney from ischemia reperfusion injury. J Clin Invest 2005; 115:610e21.
63. Conlon PJ, Stafford-Smith M, White WD, Newman MF, King S, Winn MP, Landolfo K. Acute renal failure following cardiac surgery. Nephrol Dial Transplant 1999;14:1158–1162.
64. Couser WG Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis Nephrol Dial Transplant (1998) 13 [Suppl 1]: 10–15

65. 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
66. Davidson MB, Thakkar S, Hix JK, Bhandarkar ND, Wong A, Schreiber MJ. Pathophysiology, clinical consequences, and treatment of tumor lysis syndrome. *Am J Med.* 2004;116:546-54.
67. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Bennett M, Mitsnefes MM, Barasch J, Devarajan P: Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Crit Care* 2007; 11:R127.
68. Devarajan P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology.* 2010b;15:419–28.
69. Devarajan P: Emerging biomarkers of acute kidney injury; in Ronco C, Bellomo R, Kellum JA (eds): *Acute Kidney Injury. Contrib Nephrol.* Basel, Karger, 2007, vol 156, pp 203–212.
70. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is a superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2002;40:221–6.
71. Dillon SC, Taylor GM, Shah V. Diagnostic value of urinary retinol binding protein in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1998;12:643e7.
72. Dimopoulos K, Diller GP, Koltsida E, Pijuan-Domenech A, Papadopoulou SA, Babu-Narayan SV, Salukhe TV, Piepoli MF, Poole-Wilson PA, Best N, Francis DP, Gatzoulis MA. Prevalence, predictors, and prognostic value of renal dysfunction in adults with congenital heart disease. *Circulation* 2008;117: 2320–2328
73. Dimopoulos MA, Terpos E, Chanan-Khan A, Leung N, Ludwig H, Jagannath S, Niesvizky R, Giralt S, Femand JP, Bladé J, Comenzo RL, Sezer O, Palumbo A, Harousseau JL, Richardson PG, Barlogie B, Anderson KC, Sonneveld P, Tosi P, Cavo M, Rajkumar SV, Durie BG, San Miguel J. Renal impairment in patients with multiple myeloma: a consensus statement on behalf of the International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol.* 2010;28(33):33–4976. [PubMed]

74. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front Immunol.* 2013; 4: 289.
75. Doi K, Katagiri D, Negishi K, Hasegawa S, Hamasaki Y, Fujita T, Matsubara T, Ishii T, Yahagi N, Sugaya T, Noiri E. Mild elevation of urinary biomarkers in prerenal acute kidney injury. *Kidney Int.* 2012 Nov;82(10):1114-20.
76. Drawz PE, Miller RT, Shegal AR. Predicting hospital-acquired acute kidney injury- a case-controlled study.-*Ren Fail.* 2008;30:848-855.
77. E. Andreev, M. Copman, L Arisc. A rise in plasma creatinine that is not a sign of renal failure& which drugs can be responsible? / a review/. *Journal of Internal Medicine*, 246, 1999, 247-252
78. Edelstein CL, Hoke TS, Somerset H, Fang W, Klein CL, Dinarello CA, Faubel S: Proximal tubules from caspase-1-deficient mice are protected against hypoxia-induced membrane injury. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1052-1061.
79. 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
80. Ferguson SM: CYR61 as a marker for acute renal failure. *Fed Regist* 2003; 68: 18660.
81. Finlay S<sup>1</sup>, Bray B, Lewington AJ, Hunter-Rowe CT, Banerjee A, Atkinson JM, Jones MC. Identification of risk factors associated with acute kidney injury in patients admitted to acute medical units *Clin Med (Lond)*. 2013 Jun;13(3):233-8.
82. Forman DE, Butler J, Wang Y, Abraham WT, O'Connor CM, Gottlieb SS, Loh E, Massie BM, Rich MW, Stevenson LW, Young JB, Krumholz HM. Incidence, predictors at admission, and impact of worsening renal function among patients hospitalized with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:61–67.
83. 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.
84. Gomez H<sup>1</sup>, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum JA. A Unified Theory of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury: Inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics

- and the tubular cell adaptation to injury *Shock*. 2014 Jan;41(1):3-11.
85. Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, Andrade SE, Schech SD, La Grenade L, et al. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA*. 2004;292:2585-90.
  86. Grubb A, Nyman U, Bjork J, et al. Simple cystatin C-based prediction equations for glomerular filtration rate compared with the modification of diet in renal disease prediction equation for adults and the Schwartz and the Counahan-Barratt prediction equations for children. *Clin Chem*. 2005;51(8):1420–31.
  87. Gupta BD, Sharma P, Bagla J, et al. Renal failure in asphyxiated neonates. *Indian Pediatr*. 2005;42:928–34.
  88. Gustot T. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response.-*Curr Opin Crit Care*. 2011;17:153-159
  89. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, NGAL Meta-analysis Investigator Group. 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;54:1012–24.
  90. 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
  91. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV: Kidney injury molecule- 1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62: 237–244.
  92. 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
  93. Han WK, Waikar SS, Johnson A et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int*. 2008; 73: 863-9.
  94. Hansson O, Grubb A, Lide´n A, et al. Performance evaluation of a turbidimetric cystatin C assay on different high throughput platforms. *Biomarkers in kidney disease*. Ed. C. L. Edelstein. Elsevire Inc., San Diego, 2011
  95. Harel Z, Chan CT. Predicting and preventing acute kidney injury after cardiac surgery. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 624–628.

96. Hassani K<sup>1</sup>, Hamzi AM, Hassani M, Benyahia M. Acute tubulo-interstitial nephritis with positive anti-neutrophil cytoplasmic antibodies Arab J Nephrol Transplant. 2013 Sep;6(3):177-9.
97. 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
98. 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.
99. Herget-Rosenthal S, Poppen D, Hsing J, Marggraf G, Pietruck F, Jakob HG, Philipp T, Kribben A: Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. Clin Chem. 2004 Mar;50(3):552-8.
100. Hertzberg D<sup>1</sup>, Sartipy U<sup>2</sup>, Holzmann MJ<sup>3</sup>. Type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of acute kidney injury after coronary artery bypass grafting. Am Heart J. 2015 Nov;170(5):895-902.
101. Heywood JT. The cardiorenal syndrome: lessons from the ADHERE database and treatment options. Heart Fail Rev 2004;9:195–201.
102. Hong JD, Lim IS. Correlation between glomerular filtration rate and urinary N-acetyl-beta-Dglucosaminidase in children with persistent proteinuria in chronic glomerular disease. Korean J Pediatr. 2012;55(4):136–42.
103. Hoste EA, Lameire NH, Vanholder RC et al. Acute renal failure in patients with sepsis in a surgical ICU: predictive factors, incidence, comorbidity, and outcome. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1022–1030.
104. Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome.-N Engl J Med. 2011;364:1844-1854
105. Hricik DE, Chung-Park M, Sedor JR: Glomerulonephritis N Engl J Med 1998; 339:888-899
106. Hristova J, Tzatchev K. Novel structural biomarkers for assessment of renal function and early diagnosis of acute kidney injury. Medicinski pregled, 2013; XLIX (4):5-13.
107. Hsu CY, Chertow GM, McCulloch CE, Fan D, Ordonez JD, Go AS: Nonrecovery of kidney function and death after acute on chronic renal failure. Clin J Am Soc Nephrol 2009;4:891– 898.

108. Hsu CY, Ordonez JD, Chertow GM et al. The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008; 74: 101–107.
109. Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: rhabdomyolysis—an overview for clinicians. *Crit Care*. 2005;9:158-69.
110. Hultberg B, Ravnskov U The excretion of N-acetyl-B-D-glucosaminidase in glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1981 Jan;15(1):33-8.
111. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS: Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010;176:85– 97.
112. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, McMahon AP, Bonventre JV: Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell* 2008;2:284– 291.
113. 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
114. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(7) : 4135-4142
115. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, Collins AJ: Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:223– 228.
116. 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.
117. Izzedine H, Baumelou A, Deray G: Acute renal failure in HIV patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2757–2762.
118. 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

119. 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
120. Jasuja D, Mor MK, Hartwig KC, Palevsky PM, Fine MJ, Weisbord SD. Provider knowledge of contrast-induced acute kidney injury. *Am J Med Sci* 2009;338:280–286
121. Jayagopal V, Keevil BG, Atkin SL, et al. Paradoxical changes in cystatin C and serum creatinine in patients with hypo and hyperthyroidism. *Clin Chem* 2003;49:680e1.
122. Jennette JC, Falk RJ Pathogenesis of the vascular and glomerular damage in ANCA-positive vasculitis *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13 Suppl 1:16-20.
123. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al; 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013 Jan;65(1):1-11.
124. 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
125. Karawajczyk M, Ramklint M, Larsson A. Reduced cystatin C estimated GFR and increased creatinine estimated GFR in comparison with iohexol estimated GFR in a hyperthyroid patient: a case report. *J Med Case Rep* 2008;2:66 (3 pages).
126. Knepper MA. Common sense approaches to urinary biomarker study design. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20: 1175-8.
127. Knotek M<sup>1</sup>, Rogachev B, Wang W, Ecdar T, Melnikov V, Gengaro PE, Esson M, Edelstein CL, Dinarello CA, Schrier RW. Endotoxemic renal failure in mice: Role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase *Kidney Int.* 2001 Jun;59(6):2243-9.
128. Ko GJ, Grigoryev DN, Linfert D et al. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI to CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298: F1472–F1483.
129. Kosieradzki M<sup>1</sup>, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention *Transplant Proc.* 2008 Dec;40(10):3279-88

130. 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
131. Krishnan SM, Sobey CG, Latz E, et al. IL-1beta and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? *Br J Pharmacol*. 2014; 171: 5589-5602.
132. Kuo VC, MD, Fennes AZ, MD, and Mehta AN, MD Multiple myeloma presenting as acute renal failure *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2011 Oct; 24(4): 302–305.
133. Kusaka M, Kuroyanagi Y, Mori T, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *Cell Transplant*. 2008;17(1–2):129–34.
134. Kwiatkowska E<sup>1</sup>, Domański L<sup>1</sup>, Bober J<sup>2</sup>, Kłoda K<sup>1</sup>, Safranow K<sup>3</sup>, Szymańska-Pasternak J<sup>2</sup>, Romanowski M<sup>4</sup>, Sulecka A<sup>2</sup>, Pawlik A<sup>5</sup>, Ciechanowski K<sup>1</sup>. N-acetyl-beta-glucosaminidase urine activity as a marker of early proximal tubule damage and a predictor of the long-term function of the transplanted kidneys *Acta Biochim Pol*. 2014;61(2):275-80.
135. Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ: Urinary actin, interleukin-6, and interleukin- 8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 1074–1087.
136. Lameire N. W. Van Biesen and R. Vanholder. The changing epidemiology of acute renal failure. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2, 2006, 7, 364-377
137. Lamiere N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure.- *Lancet*. 2005; 365:417-430
138. Lapteva N, Ide K, Nieda M et al (2002) Activation and suppression of renin–angiotensin system in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296:194–2002
139. Leacche M, Rawn JD, Mihaljevic T, Lin J, Karavas AN, Paul S, Byrne JG. Outcomes in patients with normal serum creatinine and with artificial renal support for acute renal failure developing after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 2004;93:353–356



140. 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
141. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005;67:2089–100.
142. Li X, Liu M, Bedja D, et al. Acute renal venous obstruction is more detrimental to the kidney than arterial occlusion: implication for murine models of acute kidney injury.-*Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302:F519-525.
143. Liangos O, Periyamayagam 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.
144. Lieberthal JG, Cuthbertson D, Carette S, Hoffman GS, Khalidi NA, Koenig CL, Langford CA, McKinnon KM, Seo P, Specks U, Ytterberg SR, Merkel PA, Monach PA, and the Vasculitis Clinical Research Consortium Urinary Biomarkers in Relapsing Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Vasculitis *Rheumatol.* 2013 May ; 40(5): 674–683
145. 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
146. 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
147. Luk CC<sup>1</sup>, Chow KM, Kwok JS, Kwan BC, Chan MH, Lai KB, Lai FM, Wang G, Li PK, Szeto CC. Urinary biomarkers for the prediction of reversibility in acute-on-chronic renal failure Dis Markers. 2013;34(3):179-85.
148. Makris K<sup>1</sup>, Spanou L<sup>1</sup> Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes, *Clin Biochem Rev.* 2016 May;37(2):85-98.
149. Malbrain ML, De laet IE: Intra-abdominal hypertension: Evolving concepts. *Clin Chest Med* 30: 45–70, viii, 2009

150. Mangano CM, Diamondstone LS, Ramsay JG, Aggarwal A, Herskowitz A, Mangano DT. Renal dysfunction after myocardial revascularization: risk factors, adverse outcomes, and hospital resource utilization. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *Ann Intern Med* 1998;128:194–203
151. Manor SM, Guillory GS, Jain SP. Clopidogrel-induced thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome after coronary artery stenting. *Pharmacotherapy*. 2004;24:664-7.
152. Markowitz GS, Perazella MA. Drug-induced renal failure: a focus on tubulointerstitial disease. *Clin Chim Acta*. 2005;351:31-47.
153. Mathioudakis NN<sup>1</sup>, Giles M<sup>1</sup>, Yeh HC<sup>2</sup>, Haywood C Jr<sup>3</sup>, Greer RC<sup>4</sup>, Golden SH<sup>5</sup>. Racial differences in acute kidney injury of hospitalized adults with diabetes. *J Diabetes Complications*. 2016 Aug;30(6):1129-36.
154. 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.
155. McCullough PA. Cardiovascular disease in chronic kidney disease from a cardiologist's perspective. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:591–600.)
156. 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
157. Melnikov VY, Ecdler 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
158. 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.)
159. Metnitz M. J. Epidemiology and naturel history of acute renal failure in the ICU *Critical Care Clinics*, 2005,10,35-41.
160. Metnitz M. J. Epidemiology and naturel history of acute renal failure in the ICU *Critical Care Clinics*, 2006,7,134-140
161. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan

- P: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365: 1231– 1238.
162. Mishra J, Ma Q, Kelly C, et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol*. 2006;21:856–63.
  163. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P: Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2534–2543.
  164. Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol*. 2004;24:307–15.
  165. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, Barasch J, Devarajan P: Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 3073–3082.
  166. Mohmand H<sup>1</sup>, Goldfarb S. Renal Dysfunction Associated with Intra-abdominal Hypertension and the Abdominal Compartment Syndrome *J Am Soc Nephrol*. 2011 Apr;22(4):615-21
  167. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure.-*Kidney Int*. 2004;66:496-499.
  168. Molls RR, Savransky V, Liu M, Bevans S, Mehta T, Tuder RM, King LS, Rabb H: Keratinocyte-derived chemokine is an early biomarker of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290:F1187– F1193.
  169. 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; 115:610e21.
  170. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int*. 2007;71(10):967–70.
  171. Moriguchi J, Inoue Y, Kamigama S, et al. N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) as the most sensitive marker of tubular dysfunction for monitoring residents in non-polluted areas. *Toxicol Lett*. 2009;190:1–8.
  172. Moulin B cardiorenal syndromes : definition and classification *Rev Prat*. 2016 Jun;66(6):608-10

173. Mullens W, Abrahams Z, Francis GS, Sokos G, Taylor DO, Starling RC, Young JB, Tang WH. Importance of venous congestion for worsening of renal function in advanced decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2009;53: 589–596.
174. Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo SK, Yuen PST, Craig L, Hu X, Star RA: Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney Int* 2002; 62: 1601–1610.
175. 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.
176. Mussap M, Dalla VM, Fioretto P, et al. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 2002;61:1453e61.
177. 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.
178. N. Calvani, H. B. Richards, M. Tucci, G. Pannarale, and F. Silvestris, “Up-regulation of IL-18 and predominance of a Th1 immune response is a hallmark of lupus nephritis,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 138, no. 1, pp. 171–178, 2004.
179. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:930-6.
180. National Kidney Foundation (2002) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 39(2 Suppl 1):S1–S266
181. Navarro JF, Mora C, Maca M, Garca J Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis.* 2003 Jul;42(1):53-61.
182. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, et al. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int* 1995;47:312e8
183. Nguyen MT, Devarajan P: Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol* 2008; 23: 2151–2157.

184. Ostermann M, Chang RW. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE.-Crit Care Med. 2007;35:1837-1843.
185. P. Hewins, M. D. Morgan, N. Holden et al., "IL-18 is upregulated in the kidney and primes neutrophil responsiveness in ANCA-associated vasculitis," *Kidney International*, vol. 69, no. 3, pp. 605–615, 2006.
186. Palevsky PM. Defining contrast-induced nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol 2009; 4:1151–1153
187. Papassotiriou GP<sup>1</sup>, Kastritis E<sup>1</sup>, Gkatzamanidou M<sup>1</sup>, Christoulas D<sup>1</sup>, Eleutherakis-Papaiakovou E<sup>1</sup>, Migkou M<sup>1</sup>, Gavriatopoulou M<sup>1</sup>, Roussou M<sup>1</sup>, Margeli A<sup>2</sup>, Papassotiriou I<sup>3</sup>, Dimopoulos MA<sup>1</sup>, Terpos E<sup>1</sup> Neutrophil Gelatinase--Associated Lipocalin and Cystatin C Are Sensitive Markers of Renal Injury in Patients With Multiple Myeloma. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2016 Jan;16(1):29-35.
188. Parikh A, Daneman D: Is carotid ultrasound a useful tool in assessing cardiovascular disease in individuals with diabetes? *Diabetes Technol Ther* 6:65– 69, 2004
189. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL: 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.
190. 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.
191. Perazella MA. Crystal-induced acute renal failure. Am J Med., 106, 1999, 4:4459-465
192. Perazella MA. Drug-induced nephropathy: an update. Expert Opin Drug Saf. 2005;4:689-706.
193. Perazella MA. Drug-induced renal failure: update on new medications and unique mechanisms of nephrotoxicity. Am J Med Sci. 2003;325:349-62
194. Perez-Blanco FJ, Garbin-Fuentes I, Perez-Chica G, Moreno-Terribas G, Rodríguez-Cuartero A et al. () Urinary activity of N-acetyl-  $\beta$ -D-glucosaminidase and progression of retinopathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Nephrol* 1997 Dec; **48(6)**:388–9.

195. Pergande M, Jing K, Precht S, Fels LM, Herbort C, Stolte H et al. Changed excretion of urinary protein and enzymes by chronic exposure to lead. *Nephrol Dial Transplant* 1994;**9**(6):613-8.
196. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992; 38; 1933-53
197. Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 2003;**362**:759–766.
198. Pisoni R, Ruggenenti P, Remuzzi G. Drug-induced thrombotic microangiopathy: incidence, prevention and management. *Drug Saf.* 2001;**24**:491-501.
199. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;**341**:709–717
200. Premaratne E, Macisaac RJ, Panagiotopoulos S, et al. Serial measurements of cystatin C are more accurate than creatinine based methods in detecting declining renal function in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2008;**31**:971e3.
201. Prescott GJ, Metcalfe W, Baharani J et al. A prospective national study of acute renal failure treated with RRT: incidence, aetiology and outcomes. *Nephrol Dial Transplant* 2007; **22**: 2513–2519.
202. Price RG (1992) The role of NAG (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. *Clin Nephrol* **38**: 14–19.
203. Rabb H: Novel urinary markers for early diagnosis of ARF. *Am J Kidney Dis* 2003; **42**: 599–600.
204. Reddy VG. Prevention of postoperative acute renal failure. *J Postgrad Med* 2002; **48**: 64–70.

205. Reinhard M, Erlandsen EJ, Randers E. Biological variation of cystatin C and creatinine. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69(8):831–6.
206. Ricci Z, Ronco C: Today's approach to the critically ill patient with acute kidney injury. *Blood Purif* 2009; 27: 127–134.
207. Ronco C. Biomarkers for acute kidney injury: is NGAL ready for clinical use? *Crit Care.* 2014 Dec 10;18(6):680.
208. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1527–39.
209. Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive Care Med* 2008;34:957–962
210. Ronco C, McCullough P, Anker SD, et al. Cardio-renal syndrome: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. *Eur Heart J.* 2010; 31: 703-711
211. Roos JF, Doust J, Tett SE, et al. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children e a meta analysis. *Clin Biochem* 2007;40:383e91.
212. Royakkers AA, van Suijlen JD, Hofstra LS, Kuiper MA, Bouman CS, Spronk PE, Schultz MJ: Serum cystatin C – A useful endogenous marker of renal function in intensive care unit patients at risk for or with acute renal failure? *Curr Med Chem* 2007; 14: 2314–2317.
213. Sabbisetti VS,\* Waikar SS,\* Antoine DJ et al. Blood Kidney Injury Molecule-1 Is a Biomarker of Acute and Chronic Kidney Injury and Predicts Progression to ESRD in Type I Diabetes *J Am Soc Nephrol.* 2014 Oct; 25(10): 2177–2186.
214. Sackner-Bernstein JD, Skopicki HA, Aaronson KD. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* 2005;111:1487–1491
215. Sanchez-Bernal C, Viltos M, Cabezas JA, Price RG et al. (1991) Variation in the isoenzymes of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and protein excretion in aminoglycoside nephrotoxicity in the rat. *Cell Biochem Funct* 9: 209.

216. Sanders PW, Booker BB. Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins. *J Clin Invest.* 1992;89(2):2–630. [[PubMed]
217. Saraheimo M, Teppo AM, Forsblom C, Fagerudd J, Groop PH Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in type 1 diabetic patients. *Diabetologia.* 2003 Oct;46(10):1402-7.
218. Schetz M, Dasta J, Goldstein S, Golper T. Drug-induced acute kidney injury *Curr Opin Crit Care.*, 11, 2005, 6:555-565
219. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A: Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; 114: 5–14.
220. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(11):1832–43.
221. Schwartz N, Hosford M, Sandoval RM, Wagner MC, Atkinson SJ, Bamburg J, Molitoris BA: Ischemia activates actin depolymerizing factor: role in proximal tubule microvillar actin alterations. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999; 276:F544–F551.
222. Serwin NM, Wiśniewska M, Jesionowska A, Skwirczyńska E, Marcinowska Z, Dołęgowska B. Serum levels of 12 renal function and injury markers in patients with glomerulonephritis *Pol Arch Med Wewn.* 2016 Aug 9;126(7-8):483-93
223. ShahrbaF FG, Assadi F Drug-induced renal disorders *J Renal Inj Prev.* 2015; 4(3): 57-60
224. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD (November 1985). "Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients". *Kidney Int.* 28 (5): 830–8.
225. Shi B, Ni Z, Cao L, et al. Serum IL-18 is closely associated with renal tubulointerstitial injury and predicts renal prognosis in IgA nephropathy. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 728417
226. Shlipak MG, Coresh J, Gansevoort RT. Cystatin C versus creatinine for kidney function-based risk. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2459.
227. Sica DA, Schoolwerth AC. Renal handling of organic anions and cations and renal excretion of uric acid. In: Brenner B, ed. *Brenner and Rector's The kidney*, 5<sup>th</sup> edn. Philadelphia: WB Saunders, 1996: 607-26.



228. Simsek A, Togcu V, Tasci AI, New Biomarkers for the Quick Detection of Acute Kidney Injury ISRN Nephrol. 2012 Nov 1;2013:394582.
229. Snoeijs MG<sup>1</sup>, van Heurn LW, Buurman WA. Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Apr;15(2):190-9
230. Solomon RJ, Mehran R, Natarajan MK, Doucet S, Katholi RE, Staniloae CS, Sharma SK, Labinaz M, Gelormini JL, Barrett BJ. Contrast-induced nephropathy and long-term adverse events: cause and effect? *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4: 1162–1169
231. Soni SS, Ronco C, Katz N, Cruz DN: Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood Purif* 2009; 28: 165–174.
232. Srisawat N, Hoste EE, Kellum JA. Modern classification of acute kidney injury. *Blood Purif*. 2010; 29: 300-7.
233. Stahl RA, Hoxha E. Glomerulonephritis *Dtsch Med Wochenschr*. 2016 Jul;141(13):960-8
234. Stewart J, Findlay G, Smith N, et al. Adding Insult to Injury: A review of the care of patients who died in hospital with a primary diagnosis of acute kidney injury (acute renal failure). National Confidential Enquiry into Patient Outcome and Death: London, UK, 2009.)
235. 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.
236. Tadesse S<sup>1</sup>, Luo G, Park JS, Kim BJ, Snegovskikh VV, Zheng T, Hodgson EJ, Arcuri F, Toti P, Parikh CR, Guller S, Norwitz ER. Intra-amniotic infection upregulates neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression at the maternal-fetal interface at term: implications for infection-related preterm birth. *Reprod Sci*. 2011 Aug;18(8):713-22.
237. 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.
238. The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325:293–302

239. 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.
240. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion.-*Clin Immunol*. 2007;123:7-13.
241. Tilman Perrin, Eric Pescomobes, Stephane Cook, 2012. Contrast-induced nephropathy in invasive cardiology-incidence, pathophysiology, diagnosis, prevention and prognosis *Swiss Med Wkly*, 142, 2012, w136088, p. 11
242. Timmeren MM, Bakker SJL, Vaidya VS, Bailly V, Schuurs TA, Damman J, Stegeman CA, Bonventre JV, Goor H: Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291:F456–F464.
243. Toto RD. Conventional measurement of renal function utilizing serum creatinine, creatinine clearance, inulin and para-aminohippuric acid clearance. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4: 505-509
244. Trof RJ, Di Maggio F, Leemreis J, Groeneveld ABJ: Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock* 2006; 26: 245–253.
245. Tsagalis G. Update of acute kidney injury: intensive care nephrology. *Hippokratia* 2011, 15, 53-68.
246. Uchida K, Gotoh A: Measurement of cystatin- C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta* 2002; 323: 121–128.
247. Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Bates S, Ronco C. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Crit care Med*. 2006; 34: 1913-1917.
248. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:463–93.
249. Vaidya VS, Ford GM, Waikar SS et al. A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int*. 2009; 76: 108-14.
250. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV: Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290:F517–F529.
251. 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.
252. Van Timmeren MM, Van Den Heuvel MC, Bailly V, Bakker SJ, Van Goor H, Stegeman CA. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J. Pathol.* 2007; 212: 209-17.
253. Venkatachalam MA<sup>1</sup>, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 May;298(5):F1078-94.
254. Venkataraman R, Kellum JA: Defining acute renal failure: the RIFLE criteria. *J Intensive Care Med* 2007; 2: 187–193.
255. Venkataraman R. Can we prevent acute kidney injury? *Crit Care Med* 2008; 36: S166–171.)
256. 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.
257. 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.
258. Wagener G, Gubitosa G, Wang S, Borregaard N, Kim M, Lee HT. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis.* 2008;52 (3):425–33.
259. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies.-*Chest.* 1997;112:676-692.
260. 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
261. Washburn KK, Zappitelli M, Arikan AA, Loftis L, Yalavarthy R, Parikh CR, Edelstein CL, Goldstein SL: Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 566–572.
262. Weidner S, Geuss S, Racht SH, Wonka A, Rupperecht HD ANCA-associated vasculitis with renal involvement: an outcome analysis *Nephrol Dial Transplant* (2004) 19: 1403–1411

263. Weisbord SD, Palevsky PM. Radiocontrast-induced acute renal failure. *J Intensive CareMed* 2005; 20:63
264. Wen X, Murugan R, Peng Z, et al. Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective.-*Contrib Nephrol.* 2010;165:39-45.,
265. Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ: Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 543–551.
266. Wheeler DS, Devarajan P, Ma Q, Harmon K, Monaco M, Cvijanovich N, Wong HR: 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: 1297–1303.
267. Wilson CB: Renal response to immunologic glomerul injury: In Brenner BM, ed. *The Kidney*, Philadelphia: WB Saunders, 1996; 1253-391
268. Wu VC<sup>1</sup>, Huang TM, Lai CF, Shiao CC, Lin YF, Chu TS, Wu PC, Chao CT, Wang JY, Kao TW, Young GH, Tsai PR, Tsai HB, Wang CL, Wu MS, Chiang WC, Tsai IJ, Hu FC, Lin SL, Chen YM, Tsai TJ, Ko WJ, Wu KD Acute-on-chronic kidney injury at hospital discharge is associated with long-term dialysis and mortality. *Kidney Int.* 2011 Dec;80(11):1222-30.
269. 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
270. Xavier Bosch, M. P. Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 4, 65-67.
271. Yang B<sup>1</sup>, Shen M. Clinicopathological analysis of patients with granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) complicated by acute renal failure *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2013 Apr 16;93(15):1159-61.
272. Zahran A, El Husseini A, Shoker A. Can cystatin C replace creatinine to estimate glomerular filtration rate? A literature review. *Am J Nephrol* 2007;27:197e205.
273. Zaremba J, Losy J: Interleukin-18 in acute ischaemic stroke patients. *Neurol Sci* 24: 117–124, 2003
274. Zhang Z, Humphreys BD, Bonventre JV: Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by

MAP kinases and juxtamembrane region. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2704–2714.

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

## Научни публикации във връзка с дисертационния труд

1. Миленова В. Уринни биологични маркери (биомаркери) за ранна бъбречна увреда. МедикАрт. 2015;8(3):61-4.
2. Миленова В. Серумни биологични маркери (биомаркери) за ранна бъбречна увреда. МедикАрт. 2015;8(4):42-4.
3. Миленова, В., Р. Кръстева, Б. Богов. Остро бъбречно увреждане при контраст–индуцирана нефропатия и необходимостта от заместителна терапия 2016;1:9-13.
4. Milenova<sup>1</sup>, V, Krasteva<sup>1</sup> R, Nikolova<sup>1</sup> M, Bogov<sup>1</sup> B, Hristova<sup>2</sup> J, Cachev<sup>2</sup> K. SERUM AND URINE BIOLOGICAL MARKERS IN ACUTE KIDNEY INJURY. Доклади на БАН. (IN PRESS)

## Научни съобщения във връзка с дисертацията

1. В. Миленова, Б. Богов, Ж. Христова, К. Цачев. Серумни и уринни биологични марекри (биомаркери) за ранна/остра бъбречна увреда. Седми конгрес по нефрология. Град Хисар, СПА хотел “Хисар”. 20-22.11.2015 г.
2. Б. Богов, Вл. Миленова. Оценка на тежестта на ОБУ и необходимостта от заместителна терапия. Контраст-индуцирана нефропатия. Училище по нефрология. КК “Пампорово”, хотел “Орфей”. 13-15.05.2016 г.
3. В. Миленова, Р. Кръстева, М. Николова, Б. Богов, Ж. Христова, К. Цачев. Серумни и уринни биомаркери за остро бъбречно увреждане, индуцирано от исхемия-реперфузия. Национална конференция по нефрология. КК “Албена”, хотел “Фламинго”. 13-16.10.2016 г.