



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА**

КАТЕДРА ПО ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ

**АНАЛИЗ НА УРИННИ МАРКЕРИ ЗА РАННА БЪБРЕЧНА УВРЕДА
И ТЯХНАТА ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ ПРИ БОЛНИ С ТАЛАСЕМИЯ
МАЙОР**

Д-р Лилия Иванова Стоянова

АВТОРЕФЕРАТ

НА

**ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ
НА НАУЧНА И ОБРАЗОВАТЕЛНА СТЕПЕН „ ДОКТОР”
НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ”**

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ

Доц. д-р Светла Василева Стайкова д.м.н.

ВАРНА 2019г

Дисертационният труд съдържа 123 стандартни страници, 33 фигури и 40 таблици.

Библиографията включва 145 литературни източника, от които 16 на кирилица и 129 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет към Катедра по „Пропедевтика на вътрешните болести”, МУ- Варна с протокол №.....

Научно жури-външни членове:

Проф. Д-р Емил Паскалев Димитров, д.м.н., Александровска болница -София

Проф. Д-р Боряна Петрова Делийска, д.м.н., УМБАЛ „ Царица Йоанна”- ИСУЛ – София

Доц. д-р Ненчо Желев Ненчев, д.м., УМБАЛ” Св. Иван Рилски”-София

Доц. д-р Велислава Димитрова Димитрова, д.м., УБ Лозенец (резервен член)

Научно жури –вътрешни членове:

Проф. д-р Валентина Христова Маджова, д.м., МБАЛ „ Св. Марина”- Варна

Доц. д-р Светла Василева Стайкова, д.м.н., МБАЛ „ Св. Марина”- Варна

Проф. Д-р Жанета Георгиева Тянева, д.м.(резервен член)

Защитата на дисертационния труд ще се състоина.....09...12.....2019г.,от.....14...часа в... АУДИТОРИЯ „ ВЛАДИМИР ИВАНОВ“ УМБАЛ „Св. Марина“ . – гр. Варна.....на открито заседание на научното жури. Материалите по защитата са на разположение в Библиотеката на МУ –Варна и на интернет страницата на МУ- Варна(mu-varna.bg)

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение.....	7
2. Цел и задачи.....	8
3. Материали, методи и бази за реализиране на дисертационния труд.....	9
3. 1. Пациенти и контроли.....	9
3.2. Лабораторни методи.....	10
3. 3. Ехографски методи.....	11
3.4. Статистически методи	13
4. Собствени резултати.....	14
4.1.Разпределение на участниците в проучването по пол и възраст.....	14
4.2. Резултати при пациенти и контролна група.....	15
4.3. Характеристика на бъбречната функция и протеинурията при пациентите с β -Таласемия майор.....	18
4.4. Анализ на албуминурията и протеинурията при пациентите на лечение с Deferipron /Ferriprox/, Deferasirox/Exjade/и Deferoxamine/Desferal/ или комбинация от медикаментите.....	26
4.5.Сравнителен анализ на лабораторните параметри: албумин/креатинин, протеин/креатинин, β 2-микроглобулин/креатинин, NGAL/креатинин, NAG/креатинин отношения на пациентите с β -Таласемия Майор и контролната група.....	28
4.6. Корелационен анализ между нивата на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL, NAG и протеинурията, албуминурията при пациентите с β -Таласемия Майор.....	31

4.7. Корелационен анализ между нивата на уринните маркери- β 2-микроглобулин, NGAL, NAG и eGFR на пациентите с β -Таласемия Майор.....	33
4.8. Корелационен анализ между феритина, претрансфузионните стойности на хемоглобина и нивата на β 2-микроглобулин, NGAL и NAG на пациентите с β -Таласемия Майор.....	34
4.9. Корелационен анализ между стойностите на β 2-микроглобулин, NGAL, NAG и продължителността на хелатиращото и хемотрансфузионното лечение на пациентите с β -Таласемия Майор.....	37
4.10. Сравнителен анализ на импедансните Доплер индекси (RI и PI) на пациентите с β -Таласемия Майор и контролната група.....	37
5. Обсъждане	46
6. Изводи.....	51
7. Заключение.....	52
8. Приноси.....	53
9. Публикации.....	53

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

B-TM	β -Таласемия Майор
B2-MГ	β 2-микроглобулин
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Неутрофилен гелатиназа-асоцииран липокалин/)
NAG	N-acetyl- β -D-glucosaminidase (N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза)
THP	Tamm-Horsfall ptotein (Протеин на Там-Хорсфал)
KIM -1	Kidney injury molecule- 1 (Молекула, увреждаща бъбрека-1)
L-FABP	L -type fatty acid binding protein (L-тип протеин, свързващ мастни киселини)
α –GST	α -glutathione S-transferase (α - Глутатион – S– Трансфераза)
RBP	Retinol binding protein (Ретинол, свързващ протеин)
AAP	Alanine aminopeptidase (Аланинаминопептидаза)
FGF-23/ α -Klotho протеин	Fibroblast growth factor -23/ α -Klotho протеин (Фибробластен растежен фактор-23/ α -Клото протеин)
ХБЗ	Хронично бъбречно заболяване
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes (Бъбречно заболяване: подобряване на глобалните резултати)
MDRD	Modification of diet in Renal Disease (Модификация на диетата при бъбречна болест)

ЕПО	Еритропоетин
RI	Resistivity index /Резистивен индекс/
PI	Pulsatility index /Пулсативен индекс/
ACR	Albumin/creatinin ratio (Албумин/креатинин отношение)
PCR	Protein/creatinin ratio (Протеин/креатинин отношение)

ВЪВЕДЕНИЕ

Болните с хемотрансфузионно - зависими анемии, към които принадлежи β -Таласемия Майор (β -ТМ) са обект на многобройни изследвания, поради обстоятелството, че при тях още в детска възраст настъпват усложнения, свързани с ексцесивното натрупване в тъканите на свободно желязо и развиваща се вторична хемосидероза и тъканна хипоксия. Задачата на медицинските специалисти, работещи в тази област е свързана с ранното откриване и проследяване на пациентите с таласемии с цел превенция на разнообразните органни увреждания.

В миналото бъбречните нарушения не са били водещо усложнение при пациентите с таласемии. Преживяемостта им е била лимитирана от тежките сърдечни увреждания (кардиомиопатии, аритмии, сърдечна недостатъчност), които са и причина за леталитет в ранна детска възраст. С подобряване грижите към болните с β -ТМ, удължаване продължителността на живота им и въвеждането на ефективни хелаторни медикаменти за редуциране на желязното натрупване в тъканите, зачестяват и реналните увреждания. Някои от болните с β -ТМ развиват гломерулна дисфункция с покачване на серумния креатинин, поява на лекостепенна протеинурия и микроалбуминурия. В други случаи бъбречните нарушения се манифестират с тубулна дисфункция. В урината на болните с β -ТМ се откриват повишени нива на β 2-микроглобулин (β 2-МГ), неутрофилен гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL), N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (NAG), протеин на Там Хорсфал (THP). Не са редки случаите на хиперкалциурия, хиперурикозурия, глюкозурия и хематурия, асоциирана с бъбречни конкременти.

Ранното изследване на пациентите значително забавя прогресията на ХБЗ. Това определя нарастващия интерес на клиницистите да търсят нови, неинвазивни и сензитивни маркери за ренална дисфункция. През последните две-три десетилетия са идентифицирани множество протеини, които бързо се индуцират в бъбрека в резултат на бъбречна увреда. Някои от тези молекули, установени в урина отговарят на специфичните нужди за диагностика на ХБЗ при болните с β -ТМ.

До настоящия момент не е провеждано друго обстойно проучване върху бъбречната функция на пациентите с β -ТМ в България. Актуални въпроси като патогенеза на реналните увреждания, ролята на хиперфилтрацията, албуминурията ,

протеинурията, нарушенията в бъбречната хемодинамиката при пациентите с β -ТМ са разгледани подробно в дисертационния труд.

2.ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се направи анализ на новите уринни маркери за ранно бъбречно увреждане: β 2-микроглобулин, NGAL и NAG при болни с β -ТМ и да се потърси тяхната предиктивна стойност за настъпване и прогресия на хронично бъбречно заболяване.

За изпълнение на целта си поставихме следните задачи:

1 Да се направи характеристика на бъбречната функция и протеинурията при пациентите с β -ТМ.

2 Да се сравнят албуминурията и протеинурията при болните на лечение с Deferiprone/ Ferriprox/, Deferasirox/Ехjage/, Deferoxamine/Desferal/ или комбинация от тези медикаменти.

3 Да се съпоставят нивата на албумин/креатинин, протеин/креатинин, β 2-микроглобулин/креатинин, NGAL/креатинин, NAG/креатинин при пациентите с β -ТМ спрямо тези на контролната група.

4 Да се потърси корелация между стойностите на феритина, претрансфузионните нива на хемоглобина и нивата на уринните маркери - β 2-микроглобулин, NGAL и NAG при пациентите с β -ТМ.

5 Да се изследва корелацията между нивата на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL, NAG и протеинурията, албуминурията и eGFR при пациентите с β -ТМ.

6 Да се потърси корелация между нивата на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL, NAG и продължителността на хемотрансфузионното и хелатиращо лечение.

7 Да се направи оценка на бъбречната хемодинамика и предиктивната роля на импедансните Доплер индекси/ RI и PI/ за настъпване на интратенални хемодинамични нарушения при болните с β -ТМ.

8 Да се анализира предиктивната стойност на уринните маркери $\beta 2$ микроглобулин, NGAL и NAG за настъпване на ранна бъбречна увреда при пациентите с β -ТМ.

3. МАТЕРИАЛИ, МЕТОДИ И БАЗИ ЗА РЕАЛИЗИРАНЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1 Център за коагулопатии и редки анемии- УМБАЛ ” Св. Марина” Варна

2 Клиника по клинична хематология- УМБАЛ ” Св. Марина” Варна

3 Клиника по Вътрешни болести – УМБАЛ ” Св. Марина ” Варна

4 Клинична лаборатория и лаборатория по Клинична имунология- УМБАЛ ” Св. Марина ” Варна

5 Департамент по социална медицина и здравеопазване – МУ Варна

3.1. Пациенти и контроли

Пациентите, участници в проучването са 44 - на средна възраст $24,3 \pm 12.71$ г., от които 18 деца / 6 момичета и 12 момчета/ и 26 възрастни / 14 жени и 12 мъже/, /изследвани през периода: м. 09 2018г. - м. 08 2019г. Диагнозата β -ТМ е доказана чрез електрофореза на хемоглобина. Всички пациенти провеждат редовни хемотрансфузии от ранна детска възраст, като интервалът е между две и пет седмици, за да се поддържа стойността на хемоглобина над 95г/л , както и хелиращо лечение, съобразено с индивидуалния риск и установеното желязно натрупване чрез магнитно-резонансна томография. По отношение на хелираща терапия - 24 от пациентите са на Eхjade, 5 на Desferal, 10 на Ferriprox, 4 на комбинирано лечение Ferriprox и Desferal, 1 пациент не провежда хелатираща терапия.

Включващи критерии: болни с β - ТМ, подписали информирано съгласие.

Исключващи критерии: болни с β - ТМ и захарен диабет, хронични гломерулонефрити, неконтролирана артериална хипертония, активни инфекции на пикочните пътища, сепсис, онкологично заболяване, бременост, прием на нефротоксични лекарства, провеждане на йодконтрастни изследвания през последния месец, лица, неподписали информирано съгласие.

Контролна група: Аprobацията на някои уропротеинни маркери при прилагане на Европейските насоки за уринен анализ (ЕС) е проведена на референтна група от 30 здрави лица - 13 деца/ 9 момичета и 4 момчета/ и 17 възрастни /12 жени и 5 мъже/, на средна възраст 23.63 ± 12.84 г., според стандарта за референтна група /IFCC/, след информирано съгласие, на директен принцип. Подборът на лицата е предварително съобразен с техните пол, възраст, анамнеза за хронични заболявания. Всички са клинично здрави, не съобщават за вродена анемия, налагаща редовни кръвопреливания, без данни за налично сърдечно-съдово, бъбречно, ендокринно или онкологично заболяване, не злоупотребяват с алкохол и упойващи вещества.

3.2.Лабораторни методи

- 1. Изследване на хемоглобиново съдържание и феритин** чрез венепункция на периферна вена преди кръвопреливане на пациентите с β - ТМ.
- 2. Изследване на бъбречната функция на пациентите с β - ТМ** чрез определяне на серумен креатинин, урея, креатининов клирънс, изчислен по формулите Schwartz за деца от 1 до 17 г. и MDRD за възрастни.
- 3. Измерване на протеин, микроалбумин, β 2-микроглобулин, NGAL, NAG** в първа сутрешна урина и отношението на посочените протеини към екскреционното креатининово ниво на пациентите и здравите контроли. Определянето на концентрациите на албумин и креатинин в еднократна порция урина, с последващо изчисление на албумин/креатинин отношение, се използва за ранна диагностика на хроничните заболявания на бъбреците. Обвързването на уринния протеин с величината на бъбречната филтрация представя по реален начин количествената характеристика на отделените с урината протеини. Анализите са установили, че албумин/креатинин отношение в първа сутрешна урина /UACR/ практически напълно съответства с резултатите при анализ на 24-часова събирана урина. Събирането и обработката на пробите се извършва по предварително дефинирани правила, отговарящи на европейските изисквания (**European Guidelines-AG**), които са:

Първа сутрешна урина, средна фракция, взета в стерилен контейнер, изследвана $\frac{1}{2}$ до 1 час след отделянето ѝ или замразена на $- 20$ С до момента на отчитането ѝ.

Креатинин в урина – Jaffe кинетично-колориметричен с пикринова киселина (за урина десетократно разреждане)- Olympus 400

Общ протеин в урина, представен в дименсия Uprotein g/l – пирогалол и молибдат с колориметричен завършек- Olympus 400

Микроалбумин, представен в дименсия Ualbumin mg/l- имунотурбидиметрия- Olympus 400

β 2-микроглобулин, представен в дименсия U β 2-microglobulin mg/ml

Неутрофилен гелатиназа – асоцииран липокалин, представен в дименсия UNGAL ng/ml

N-ацетил - β -D-глюкозаминидаза, представен в дименсия UNAG U/l

Определяне на β -2-микроглобулин в урина.

Определянето на β -2-микроглобулин в урина е извършено чрез ELISA с готов тестов набор Human β 2-Microglobulin Assay, на фирмата R&D Systems, според протокола на производителя при разреждане на урината 2 пъти, като концентрацията е изразена в мерна единица mg/ml.

Определяне на липокалин-2/NGAL в урина.

Определянето на липокалин-2/NGAL в урина е извършено чрез ELISA с готов тестов набор Human Lipocalin-2/NGAL Immunoassay, според протокола на производителя при разреждане на урината 10 пъти, като концентрацията е изразена в мерна единица ng/mL.

Определяне на N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (NAGase) в урина.

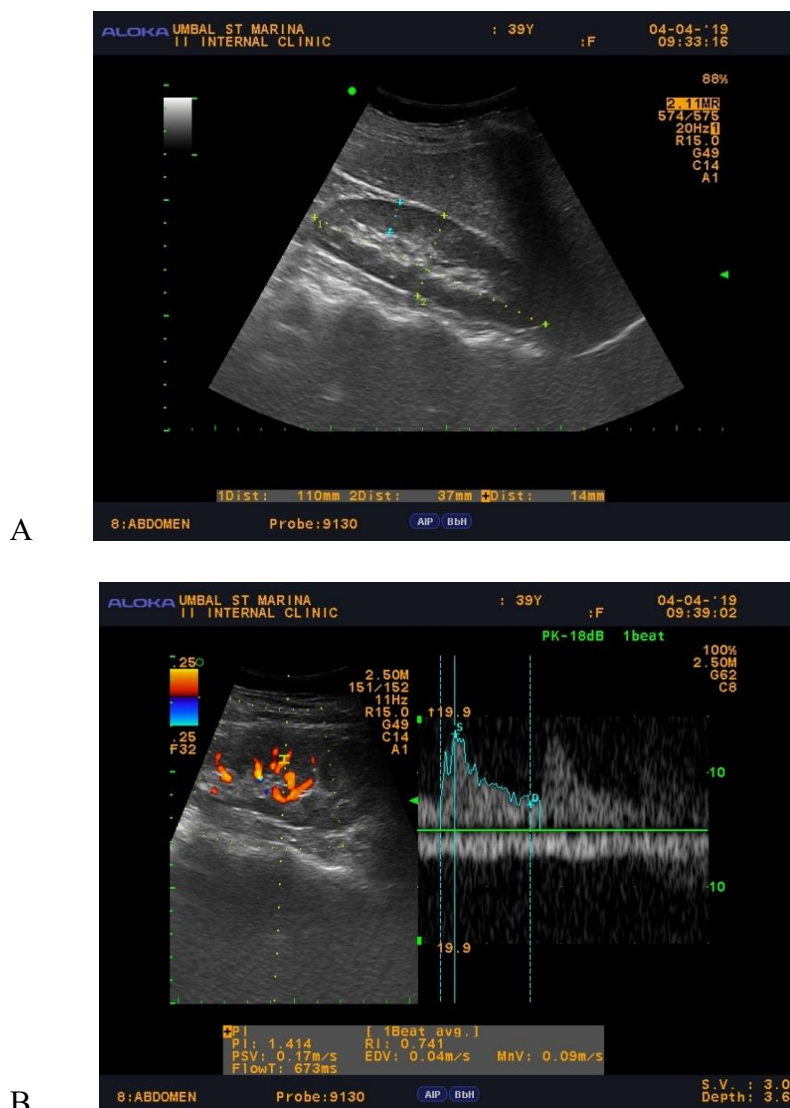
Определянето на N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза в урина е извършено чрез ELISA с готов тестов набор Human N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) ELISA Kit, Великобритания, според протокола на производителя без разреждане на урината, като концентрацията е изразена в мерна единица U/l.

3.3. Ехографски методи

Ехографският метод е неинвазивен, безвреден и широко достъпен в нефрологичната практика. Използването на Пулсов Доплер при изследването на

импедансните индекси /RI и PI/ дава възможност да се открият промени в периферното съдово съпротивление.

Резистивният индекс /RI/ корелира с гломерулната филтрация и бъбречния плазмен ток; с васкуларната резистентност; с тежестта на бъбречното увреждане. Използва се конвексен трансдюзер, като в началото на изследването се извършва B-mode скениране, след това Doppler - скениране на двата бъбрека (фиг.1) .Извършват се три измервания на ниво аркуатни или интерлобарни артерии в горна, средна и долна трета на двата бъбрека , като се определя средната величина на RI и PI.



Фиг.1 С.Г.М на 39 г. с β -ТМ, (А) B-mode скениране на бъбрек, (В) Pulse Doppler /RI-0,74; PI-1,41/

3.4. Статистически методи

Настоящата работа включи различни дескриптивни и аналитични методи, базирани на параметрични и непараметрични тестове, адресиращи задачите на изследването.

Дескриптивен метод

Дескриптивен анализ е използван за описание на основните характеристики на извадката и на показателите, включени в изследването. За основа на анализа са включени измерители на централните тенденции като средна аритметична стойност със стандартно отклонение и непараметрични тестове, като кростабулация и хи-квадрат при търсене на значими разлики в честотно представяне на категорийни стойности. Статистическа значимост при непараметричните тестове е приемана при $p \leq 0.05$.

Аналитичен метод

T –test е използван за сравняване на средните величини на показателите между контроли и изследваните болни. Статистически значими са разликите между групите при $p \leq 0.05$.

Корелационен анализ е използван за изследване на зависимостите между клиничните показатели. Оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на резултатите от коефициента на Пирсън (r).

“ROC” графичен анализ е използван за определяне ролята на точността и специфичността на предвидимостта за развитие на бъбречна увреда.

Сравнителен анализ се направи с U критерия на Mann-Whitney (за две независими извадки).

4.РЕЗУЛТАТИ

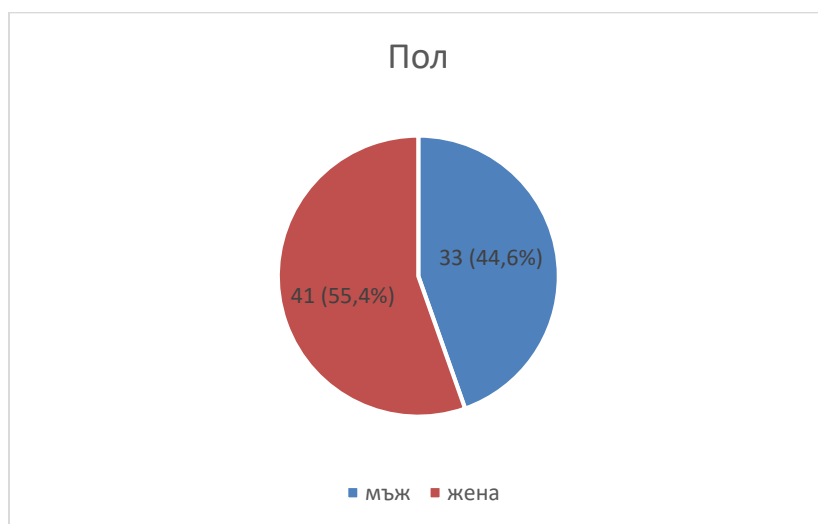
4.1. Разпределение на участници в проучването по пол и възраст

В таблиците са използвани честотен анализ и анализ на средните стойности. В проценти е показана честотата на съответния показател. Участниците в проучването са 74 - 33 мъже (44,6%) и 41 жени (55,4%). Представени са средно аритметичната стойност и стандартното отклонение(SD) на променливите. Минимална възраст на участниците е 7 г., максимална възраст- 57 г., средно аритметична стойност – 24,03 ± 12,770 г.(табл.1)

Табл. №1 Разпределение на участниците в проучването по възраст

	Минимална възраст	Максимална възраст	Средна аритметична стойност	Стандартно отклонение
възраст	7	57	24,03	± 12,770

Използван е и графичен анализ, с който са представени графични изображения на променливите – Excel 2019 (фиг.2)



Фиг. №2 Разпределение по пол на 74 участници в проучването

4.2. Резултати при пациенти и контроли

Резултатите са представени в две групи: I група пациенти с β -Таласемия майор и II група – здрави контроли.

Табл. №2 Характеристика на участниците в проучването

показатели	Пациенти	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна аритметичност	Стандартно отклонение
НЬ	44	49	111	86,36	$\pm 9,862$
Феритин	44	115,0	9500	2254,570	$\pm 2200,1814$
Урея	44	2,40	9,1	5,7955	$\pm 1,67692$
Креатинин	44	25,00	77	47,5682	$\pm 12,04333$
eGFR	44	79,00	225	151,2500	$\pm 41,18880$
алб./креат	74	0,01	56,29	4,2838	$\pm 11,24351$
протеин/креат.	74	0,70	126,46	15,6708	$\pm 21,88733$
NGAL/креат.	74	0,0001	8,5870	0,264681	$\pm 1,2102104$
NAG/креат.	74	0,0001	0,3400	0,023859	$\pm 0,0589621$
B2 МГ/креат.	74	0,0000	9,4690	3,009041	$\pm 2,6037380$
RI	74	0,51	0,79	0,6446	$\pm 0,06383$
PI	74	0,66	1,58	1,0658	$\pm 0,20246$

Описателна статистика по групи- контроли и пациенти с β –таласемия

Табл.№ 3 Характеристика на пациентите по възраст с β - таласемия

	Брой	Минимална възраст	Максимална възраст	Средна възраст	Стандартно отклонение
Възраст	44	7	57	24,30	$\pm 12,713$

Табл. №4 Характеристика на пациентите по пол с β -таласемия

пол	Брой	%
мъж	24	54,5
Жена	20	45,5
Общо	44	100,0

Табл.№.5 Характеристика на пациентите и резултати по изследваните показатели

ПОКАЗАТЕЛИ	Брой	Минимална	Максимална	Средна стойност	Стандартно отклонение
Нв	44	49	111	86,36	$\pm 9,862$
Феритин	44	115,0	9500,0	2254,570	$\pm 2200,1814$
Урея	44	0,70	126,46	20,4611	$\pm 26,81915$
eGFR	44	79,00	225,00	151,2500	$\pm 41,18880$
Креатинин	44	25,00	77,0	46,5681	$\pm 12,04333$
алб/креатинин	44	0,01	53,42	5,4332	$\pm 10,51014$
B2 МГ/креатинин	44	0	9,4690	3,392591	$\pm 2,723879$
протеин/креат.	44	0,70	126,46	20,4611	$\pm 26,81915$
NGAL/креатинин	44	0,0001	0,2580	0,010634	$\pm 0,0407796$
NAG/креатинин	44	0,0001	0,3400	0,028384	$\pm 0,0706625$
RI	44	0,58	0,79	0,6789	$\pm 0,05091$
PI	44	0,89	1,58	1,1655	$\pm 0,18242$
хелатиращо лечение	43	1,00	40,00	15,3023	$\pm 10,39124$
хемотрансфузионно лечение	44	6,00	49,00	20,6136	$\pm 11,74183$

Табл.№6 Разпределение на пациентите спрямо провежданото лечение с хелаторен медикамент

Хелатор	Брой	%
Няма	1	2,3
Ferriprox	10	22,7
Ехjade	24	54,5
Desferal	5	11,4
Ferriprox, Desferal	4	9,1
Total	44	100,0

Най-голям е процентът на пациентите на лечение с Ехjade (54,5%), следвани от тези на лечение с Ferriprox (22,7%), 11,4% провеждат терапия с Desferal, най-нисък е процентът на пациентите на комбинирано лечение с Ferriprox и Desferal /9,1 % / и само 2,3% не провеждат хелаторно лечение . Мъжете на лечение с Ехjade са 45,8%, а на комбинирано лечение с Ferriprox и Desferal са 12,5%. Жените на терапия с Ехjade са 65 % , само 5% са на комбинацията Ferriprox и Desferal.

Табл.№ 7 Характеристика на контролната група пациенти по пол

	Брой	%
Мъж	9	30,0
Жена	21	70,0
Общо	30	100%

Табл. № 8Характеристика на контролната група пациенти по възраст

	Брой	Минимална възраст	Максимална възраст	Средна възраст	Стандартно отклонение
възраст	30	7	48	23,63	13,061

Табл. №9 Характеристика на резултати по изследваните показатели при контролната група пациенти

показатели	Брой	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
B2 МГ/креат.	30	0	8,3650	2,531000	± 2,1676115
алб/креатинин	30	0,01	4,01	0,6520	± 1,12433
протеин/креат.	30	1,55	32,00	9,3807	± 7,12101
NGAL/креат.	30	0	0,190	0,002233	± 0,0037268
NAG/креатинин	30	0,0002	0,1800	0,018363	± 0,0353029
RI	30	0,51	0,67	0,5943	± 0,04493
PI	30	0,66	1,15	0,9197	± 0,12915

Анализът показва, че при здравите контроли B2-МГ/креатинин е от 0-8,365mg/mol., средна стойност 2,531000± 2,1676115 SD, албумин/креатинин варира от 0,01 до 4,01g/mol., средна стойност 0,6520 ± 1,12433 SD, протеин/креатинин е в стойностите 1,55-32,0 g/mol., средна стойност 9,3807± 7,12101 SD, NGAL/креатинин 0,00020-0,1800 ng/mol., средна стойност 0,002233 ± 0,0037268 SD, NAG/креатинин 0,0002-0,1800 U/mol., средна стойност 0,002233± 0,0353029 SD, RI 0,51-0,67, средна стойност 0,5943 ± 0,04493 SD, PI 0,66-1,15, средна стойност 0,9197 ± 0,12915 SD.

4.3.Характеристика на бъбречната функция и протеинурията при пациентите с β-Таласемия Майор

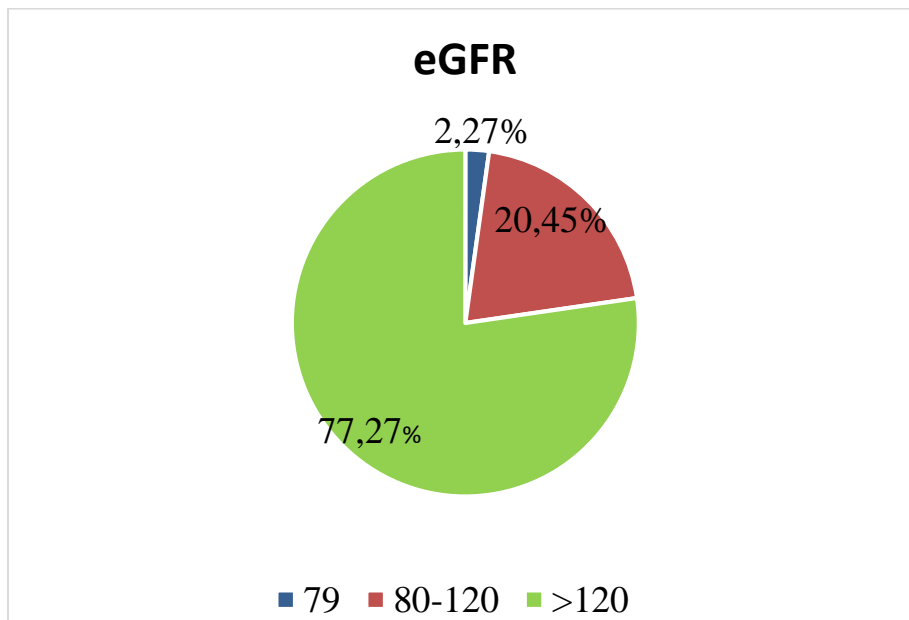
Пациентите участници в проучването имат стойности на урея 3,20-8,90 mmol/l, серумен креатинин 25-77 μmol/l, средна стойност 46,568 ± 12,04333 SD, eGFR-79,00 до 225,00 ml/min , средна с-ст 151,25 ml/min± 41,18880 SD. Гломерулната филтрация е изчислена по формулата на Schwartz за деца от 1-17г. и MDRD за възрастни пациенти.

Формула на Schwartz: $CrCL = k \cdot Ht / Cr \text{ serum mL/min/1.73 m}^2$, където k е коефициент, различен спрямо възрастовата група, Ht -височина на детето /см./, $Cr \text{ serum}$ - серумен креатинин/ $\mu\text{mol/l}$

MDRD- $GFR \text{ in mL/min/1.73 m}^2 = 175 \times SerumCr^{-1.154} \times age^{-0.203} \times 1.212$ (черната раса) $\times 0.742$ (жени).

Пациентите с β -ТМ са с хиперфилтрация (средна стойност на $eGFR$ -151,25 $\text{ml/min} \pm 41,18880 \text{ SD}$).

На фиг. 3 е показана в % гломерулната филтрация при болните с β -ТМ, от които 77,2% са с $eGFR > 120$ ml./мин.



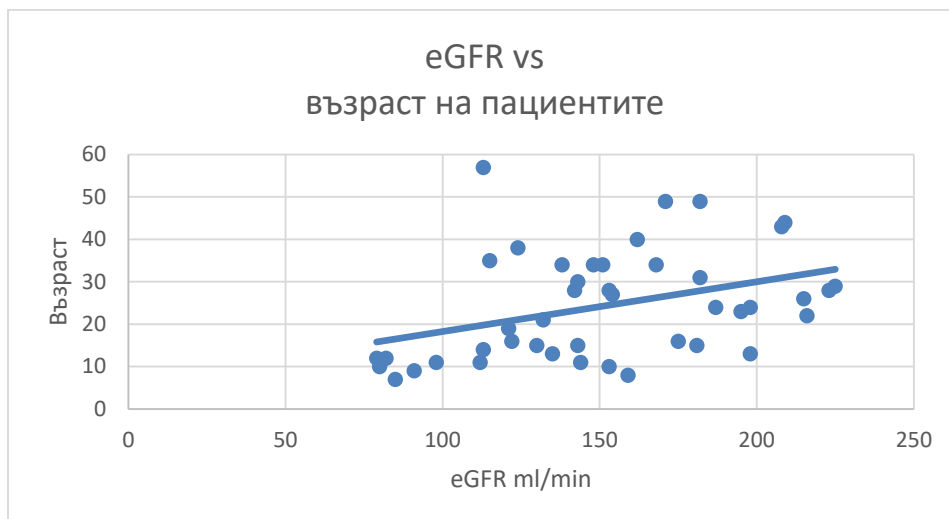
Фиг. №3 Гломерулна филтрация на пациентите с β -ТМ, изразена в проценти.

Табл.№10 Корелация на Pearson

Показатели		eGFR	възраст	креатинин	феритин
eGFR	Pearson Correlation	1	0,380	-0,689	0,511
	P		0,011	0,0001	0,0001
	N	44	44	44	44
възраст	Pearson Correlation	0,380	1	0,034	0,281
	P	0,011		0,829	0,064
	N	44	74	44	44
креатинин	Pearson Correlation	-0,689	0,034	1	-0,259
	P	0,0001	0,829		0,089
	N	44	44	44	44
Феритин	Pearson Correlation	0,511	0,281	-0,259	1
	P	0,0001	0,064	0,089	
	N	44	44	44	44

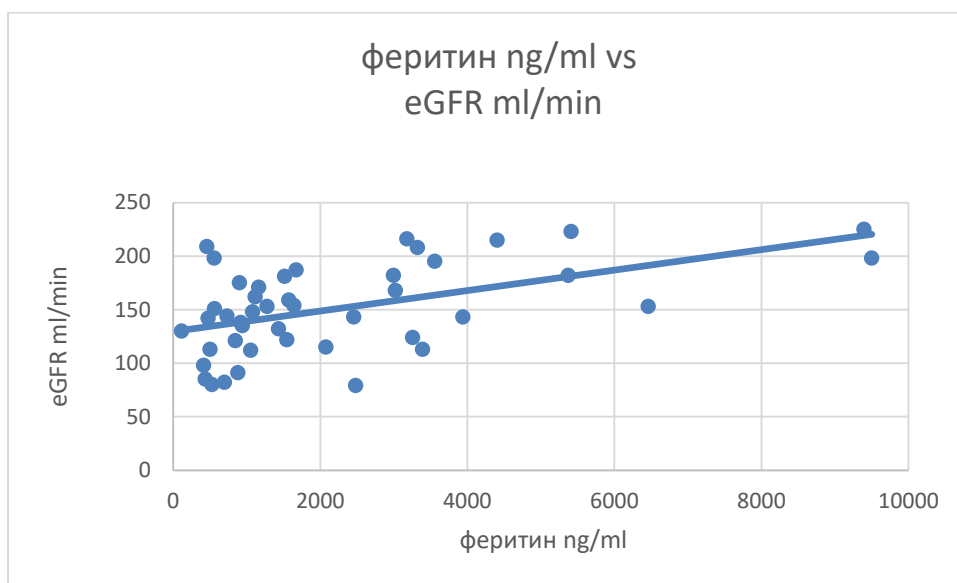
На табл. 10 са представени данните от сравнителния анализ между eGFR, възраст, креатинин, феритин на изследваните пациенти.

Резултатите показаха сигнификантна положителна корелативна връзка между eGFR и възрастта ($p=0,011$), а също между eGFR и нивото на феритина ($p=0,0001$) и сигнификантна отрицателна корелация между eGFR и стойностите на серумния креатинин($p=0,0001$).



Фиг.№4 Положителна корелация между eGFR и възрастта на пациентите с β -ТМ

Представихме графично корелацията между eGFR и възрастта на пациентите с β -ТМ. (фиг.4) Установи се , че с увеличаване на възрастта нараства eGFR.



Фиг. №5 Положителна корелация между eGFR и нивата на феритина при пациентите с β -ТМ

Представихме графично корелацията между eGFR и нивата на феритина на пациентите с β -ТМ (фиг. 5) С увеличаване стойностите на феритина нараства eGFR.



Фиг. №6 Разпределение на пациентите спрямо нивата на феритина

На фиг. 6 графично са представени в % пациентите с нива на феритина <1000ng/ml(36,36%), от 1000 до 3000 ng/ml(34,09%), над 3000 ng/ml(29,55%). Анализът показва , че около 1/3 от изследваната група пациенти са със значително завишени нива на феритина над 3000 ng/ml, което се асоциира с жлезен свръхтовар и органични увреждания.

Характеристика на протеинурията при пациенти с β -ТМ

Международната фондация за диабет и Националният институт за клинични постижения препоръчват праг на ACR от 2,5 mg/mol за мъже и 3,5 mg/mol за жени.

Представихме албинурията и протеинурията при различните възрастови групи пациенти с β -ТМ. (табл. 11, табл. 12, табл. 13, табл. 14, табл. 15)

Табл. №11 Характеристика на албуминурията и протеинурията при пациентите на възраст 7-17 години

	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
протеин/ креатинин	18	0,70	126,46	20,8994	± 33,46359
албумин/ креатинин	18	0,02	56,29	6,8761	± 17,47684
Valid N (listwise)	18				

Табл. №12 Характеристика на албуминурията и протеинурията при пациентите на възраст 18-27 години

	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
протеин/ креатинин	8	2,62	57,80	17,3563	± 18,00132
албумин/ креатинин	8	0,01	35,37	5,9175	± 11,95668
Valid N (listwise)	8				

Табл. № 13 Характеристика на албуминурията и протеинурията при пациентите на възраст 28-37 години

	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
протеин/ креатинин	11	3,33	86,24	18,7036	± 23,82861
албумин/ креатинин	11	0,02	28,76	4,8355	± 8,36059
Valid N (listwise)	11				

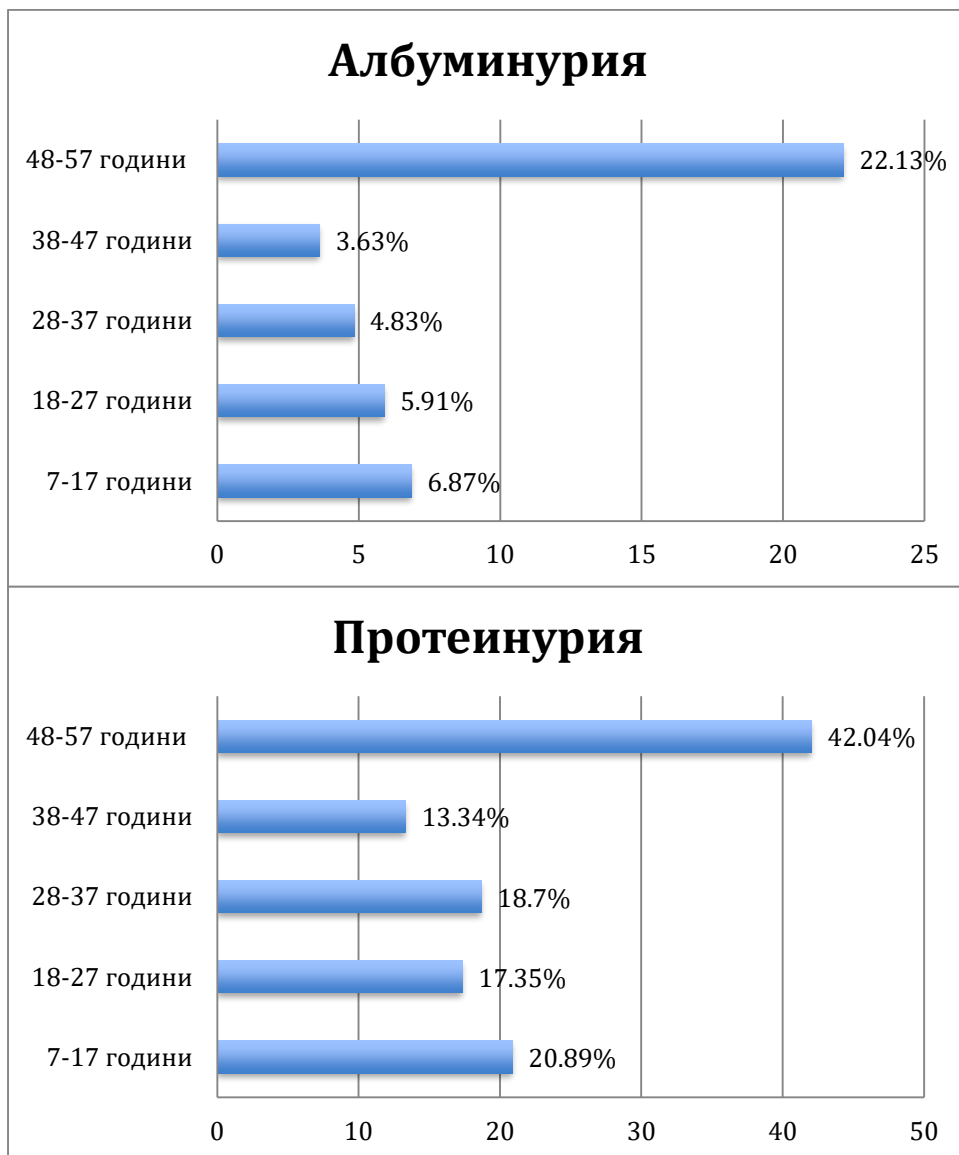
Табл.№ 14 Характеристика на албуминурията и протеинурията при пациентите на възраст 38-47 години

	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
протеин/ креатинин	4	5,37	29,08	13,3450	±10,87138
албумин/ креатинин	4	0,40	8,89	3,6375	± 3,89638
Valid N (listwise)	4				

Табл.№ 15 Характеристика на албуминурията и протеинурията при пациентите на възраст 48-57 години

	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
протеин/ креатинин	3	6,72	61,23	42,0433	± 30,62889
албумин/ креатинин	3	1,25	37,62	22,1300	± 18,77454
Valid N (listwise)	3				

Чрез дескриптивен анализ се установи албуминурия–(албумин/креатинин отношение – мин. с-ст 0,01, макс. с-ст 53,42, средна с-ст 5,4332g/mol± 10,51014 SD) и протеинурия (протеин/креатинин отношение мин.с-ст- 0,7, макс. с-ст 126,46, средна с-ст 20,4611g/mol ± 26,81915 SD) при изследваните пациенти.



Фиг. №7 Графично представяне в проценти протеинурията и албуминурията при различните възрастови групи пациенти с β –ТМ

Данните от сравнителния анализ показва връзка между възрастта на пациентите с β – ТМ и албуминурията и протеинурията. Факторът - възраст има отношение към тези показатели на бъбречната функция. Най-високи стойности на албумин/креатинин и протеин/креатинин отношенията са регистрирани при пациентите от 48 до 57 годишна възраст, съответно 20,8994 g/mol и 42,0433 g/mol. При децата с β – ТМ на възраст от 7 до 17 г. албуминурията е три пъти по-ниска, а протеинурията два пъти по-ниска спрямо тези на пациентите от 47-56 годишна възраст, съответно 6,8761 g/mol и 20,8994 g/mol. Вероятно с напредване на възрастта нараства протеинурията и албуминурията при пациентите с β – ТМ.

4.4. Анализ на албинурия и протеинурия при пациентите на лечение с Deferipron /Ferriprox/, Deferasirox/Exjade/и Deferoxamine/Desferal/ или комбинация от медикаментите.

Извършихме дискриптивен анализ на албинурия и протеинурия при пациентите с β -ТМ, провеждащи лечение с Ferriprox, Exjade, Desferal и комбинация Ferriprox и Desferal. На хелаторно лечение са 43 пациента, като най-голям е процентът на провеждащите лечение с Exjade (54,5%), а най-малък е процентът на болните на комбинирано лечение с Ferriprox и Desferal

Табл.№ 16 Нива на албинурия и протеинурия при пациентите на лечение с Ferriprox

Ferriprox	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
албумин/креатинин	10	0.28	37.62	7.6470	± 13.39202
протеин/креатинин	10	0.70	61.23	18.2540	± 22.42223

Табл. № 17 Нива на албинурия и протеинурия при пациентите на лечение с Exjade

Exjade	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
албумин/креатинин	24	0.02	53.42	5.4271	± 11.82412
протеин/креатинин	24	2.56	91.94	20.2850	± 22.82339

Табл. №18 Нива на албинурия и протеинурия при пациентите на лечение Desferal

Desferal	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
албумин/креатинин	5	0.02	35.37	7.5940	± 15.53572
протеин/креатинин	5	3.33	57.80	15.4160	± 23.73261

Табл. №19 Нива албинурията и протеинурията при пациентите на лечение с Ferriprox/Desferal.

Ferriprox/ Desferal	N	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
албумин/креатинин	4	0.01	2.65	1.0650	± 1.28873
протеин/креатинин	4	4.26	9.27	6.8425	± 2.27320

Табл.№ 20 Сравнение на албинурията и протеинурията при пациентите на лечение с Ferriprox, Exjade, Desferal и комбинация Ferriprox/Desferal

	Протеин/креатинин	Албумин/креатинин
Ferriprox	18.25	7.64
Exjade	20.28	5.42
Desferal	15.41	7.59
Ferriprox/Desferal	6.84	1.06

Извършихме сравнителен анализ на албинурията и протеинурията при пациентите с β -ТМ, провеждащи лечение с Ferriprox, Exjade, Desferal и комбинация Ferriprox/Desferal. Установихме най-висока стойност на АСР -7.64 g/mol при болните на терапия с Ferriprox, следвани от тези на лечение с Desferal –АСР-7.59 g/mol. Пациентите на комбинирано лечение с Ferriprox/Desferal са с албинурия в границите на нормата-АСР1.06 g/mol. Най-високи стойности на протеинурия е регистрирана при болните на лечение с Exjade - PCR -20.28g/mol., следвани от тези на лечение с Ferriprox-PCR-18.25 g/mol. Пациентите на комбинирано лечение с Ferriprox/Desferal са с най-ниски стойности на протеин в урина-PCR-6.84 g/mol. Резултатите от анализа показват, че пациентите на комбинирано лечение с Ferriprox/Desferal са с нормални стойности на албумин и протеин в урина. Оказва се, че комбинацията Ferriprox/Desferal е най-щадяща бъбрека хелатираща терапия по отношение на протеинурията. Тя може да се

обсъжда при пациентите с установени странични действия от лечението с Eхjade. Най-висок риск от поява на протеинурия се установява при болните на терапия с Eхjade.

4.5. Сравнителен анализ на лабораторните параметри: албумин/креатинин, протеин/креатинин, β 2-микроглобулин/креатинин, NGAL/креатинин, NAG/креатинин отношения на пациенти с β -ТМ и контролна група.

Подбрахме референтната група според изискванията на IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) и изработихме референтни граници на изследваните от нас лабораторни параметри, представени в посочените от нас дименсии: β 2-микроглобулин/креатинин mg/mol, NGAL/креатинин ng/mol., NAG/креатинин U/mol

Табл. №21 Граници на стойностите за изследваните биохимични биомаркери при контролната група пациенти

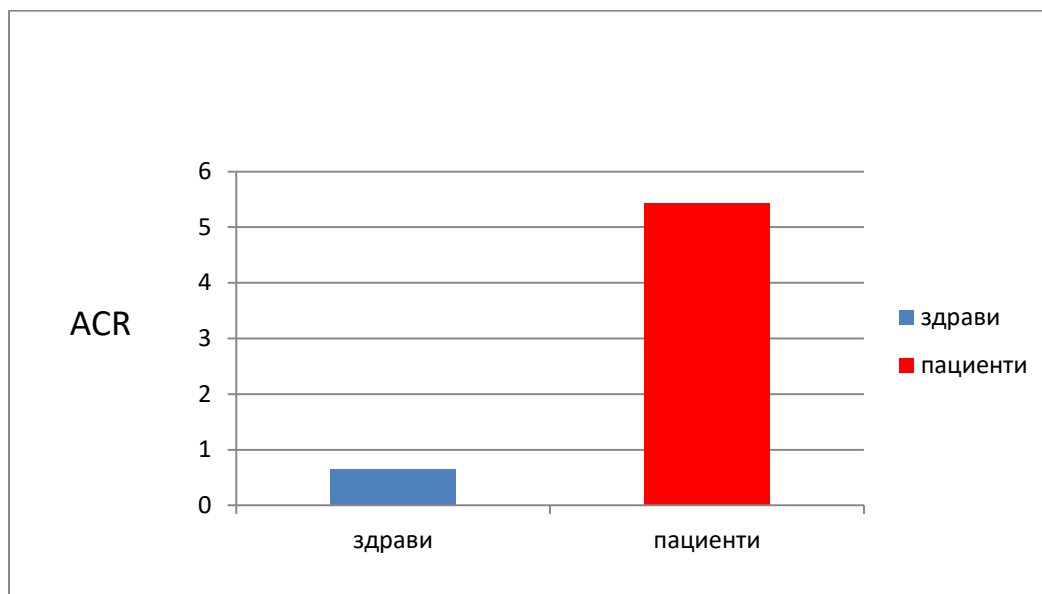
Биомаркер	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
B2-МГ/креатинин	0	8,3650	2,531000	2,1676115
NGAL/креатинин	0	0,0190	0,002233	0,0037268
NAG/креатинин	0,0002	0,1800	0,018363	0,0353029

Табл. №22 Mann-Whitney U Test

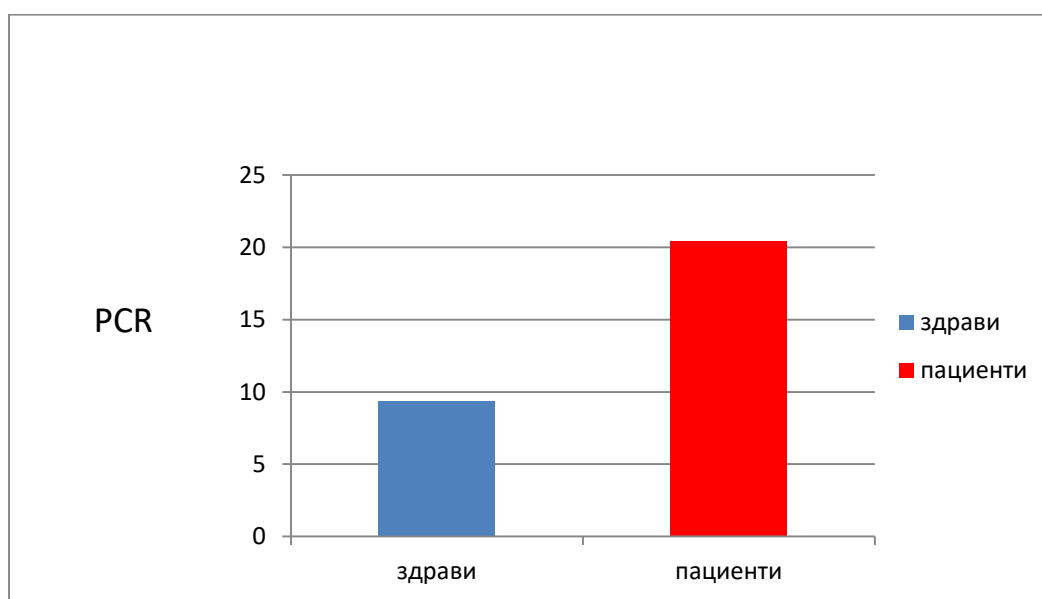
Показател	контроли	пациенти	U test/ Z	P
албумин/креатинин	0.6313 \pm 1.1114	6.9373 \pm 14.006	-2.497	0,015
протеин/креатинин	9,3807 \pm 7,1210	20,4611 \pm 26,819	-2,350	0,023
NGAL/креатинин	0,0022 \pm 0,0037	0,0106 \pm 0,040	2,247	0,028
NAG/креатинин	0,0183 \pm 0,0353	0,0283 \pm 0,0706	-0,894	0,375
β 2-МГ/креатинин	2,5310 \pm 2,1676	3,393 \pm 2,7238	-1,594	0,116
RI	0,5943 \pm 0,044	0,6789 \pm 0,050	-7,525	0,0001
PI	0,9197 \pm 0,129	1,1655 \pm 0,1824	-6,366	0,0001

На табл.22 са представени корелации между параметрите албумин/креатинин, протеин/креатинин, В2-МГ/креатинин, NGAL/креатинин, NAG/креатинин при болни и контроли чрез Mann-WhitneyUTest. Установи се статистически значима разлика при показателите албумин/креатинин ($p=0,015$), протеин/креатинин ($p=0,023$) и NGAL/креатинин($p=0,028$) между изследваните групи.

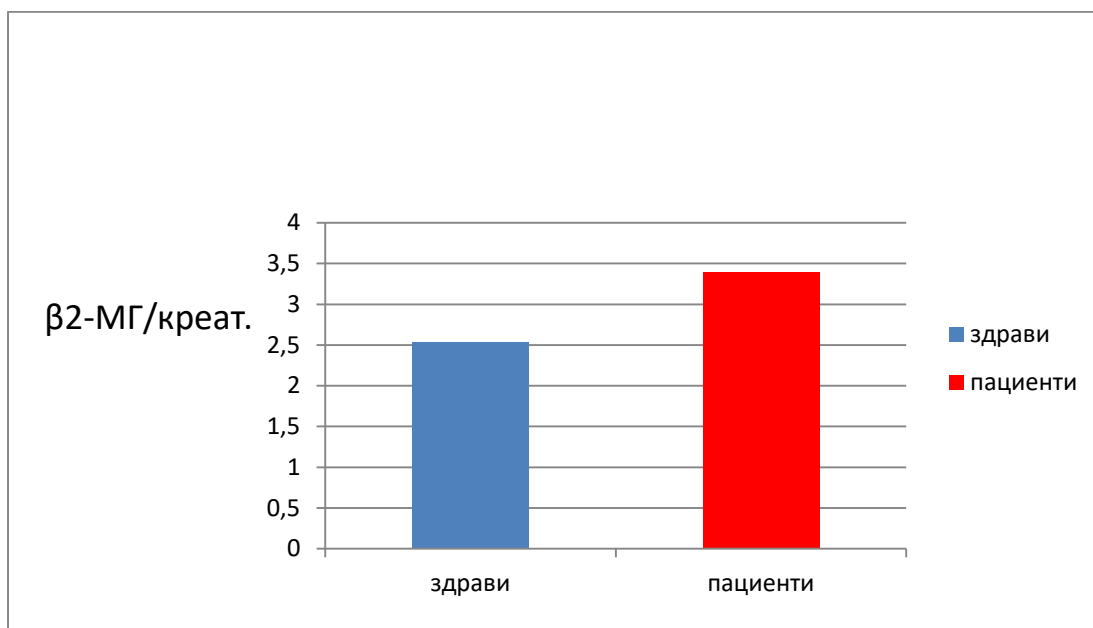
Статистическите разлики на посочените показатели са представени и графично.



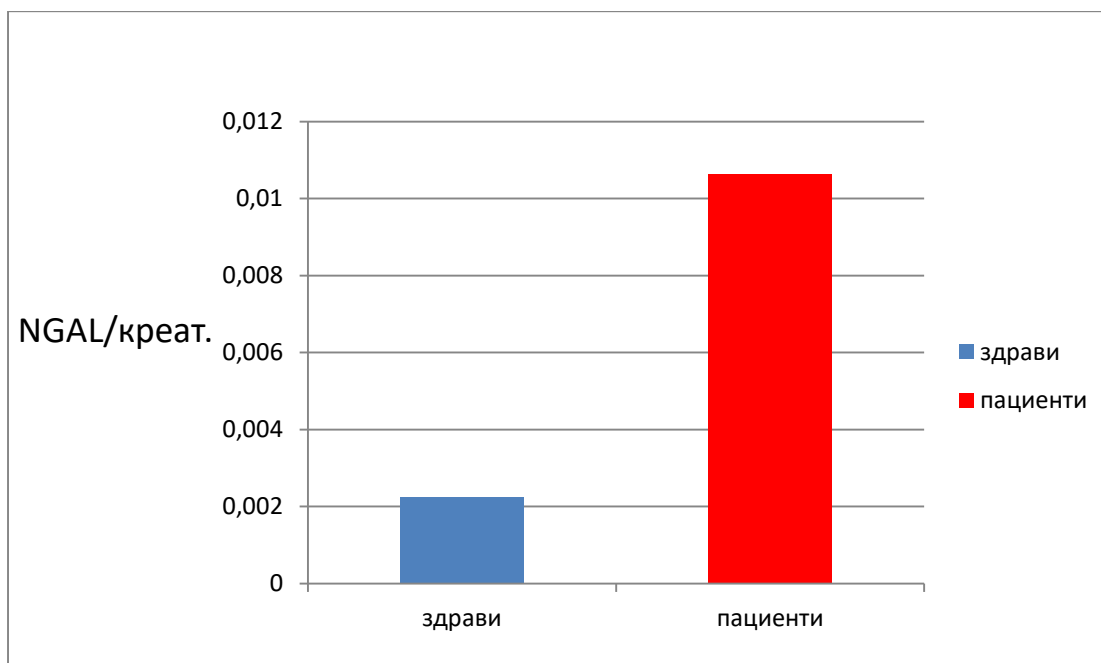
Фиг. № 8 Разлика в ACR при пациенти и здрави контроли



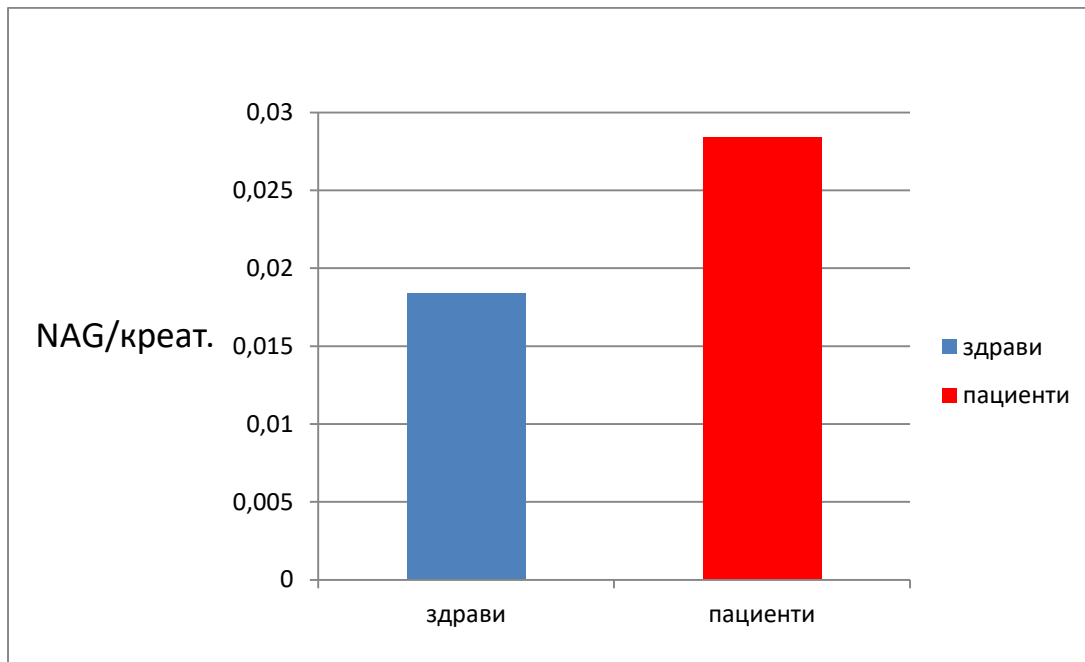
Фиг.№ 9 Разлика в PCR при пациенти и здрави контроли



Фиг.№ 10 Разлика в β2-МГ/креатинин отношение при пациенти и здрави контроли



Фиг.№ 11 Разлика в NGAL/креатинин отношение при пациенти и здрави контроли



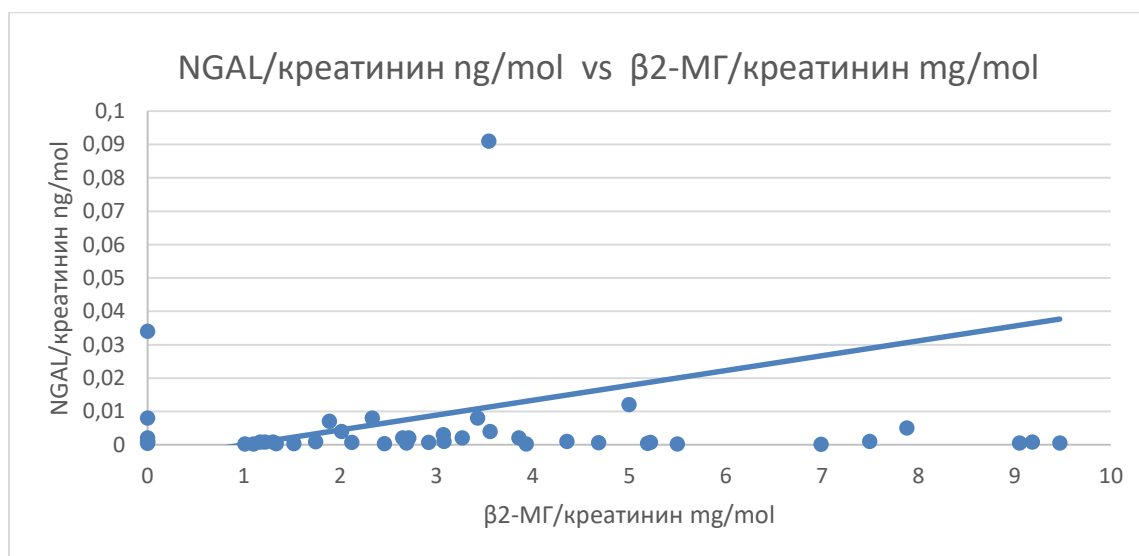
Фиг.№12 Разлика в NAG/креатинин отношение при пациенти и здрави контроли.

4.6. Корелационен анализ между нивата на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL, NAG и протеинурията, албуминурията на пациенти с β -ТМ.

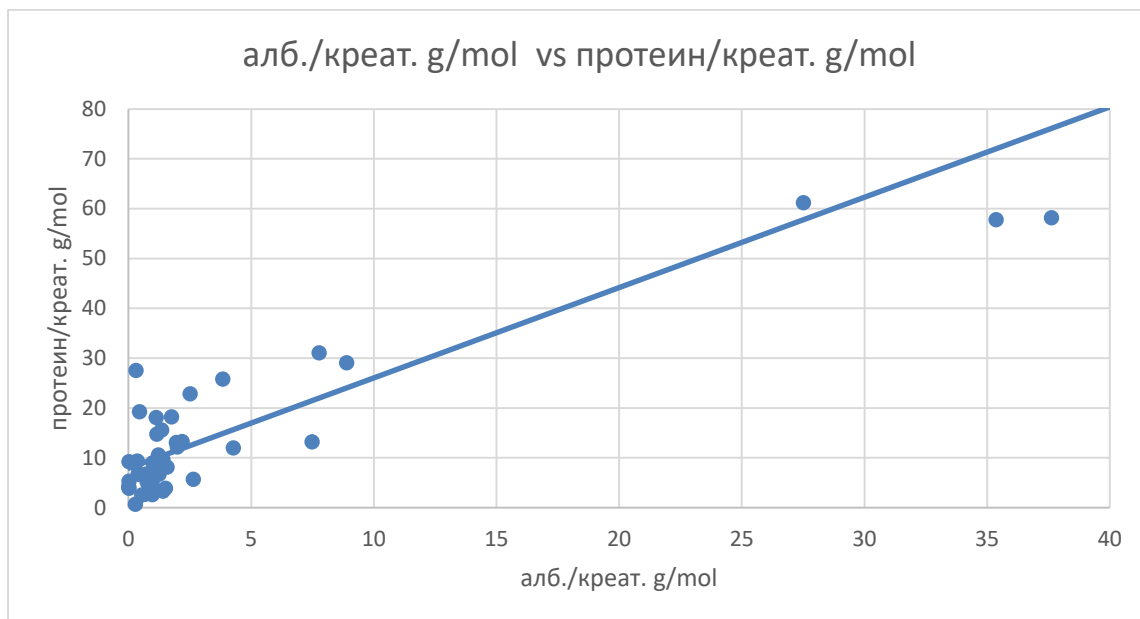
От направения анализ не се установи корелация между албумин/креатинин, протеин/креатинин отношения и нивата на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL и NAG при изследваните пациенти.(табл. 23) Доказа се положителна корелативна връзка между β 2-МГ/ креатинин и NGAL/креатинин отношения (p -0.050, r -0.297), а също между албумин/креатинин и протеин/креатинин отношения (p -0,0001, r -0.947) при пациентите с β -ТМ.(фиг.13, фиг.14)

Табл.№ 23 Корелация на Pearson

		албумин/ креатинин	протеин/ креатинин	NGAL/ креатинин	NAG/ креатинин	β2-МГ/ креатинин
албумин/ креатинин	Pearson	1	0.947	-0.073	-0.047	0.023
	Correlation					
	P		0.0001	0.636	0.761	0.882
	N	44	44	44	44	44
протеин/ креатинин	Pearson	0.947	1	-0.086	0.026	-0.071
	Correlation					
	P	0.0001		0.580	0.868	0.647
	N	44	44	44	44	44
NGAL/ креатинин	Pearson	-0.073	-0.086	1	-0.011	0.297
	Correlation					
	P	0.636	0.580		0.944	0.050
	N	44	44	44	44	44
NAG/ креатинин	Pearson	-0.047	0.026	-0.011	1	-0.231
	Correlation					
	P	0.761	0.868	0.944		0.132
	N	44	44	44	44	44
β2-МГ/ креатинин	Pearson	0.023	-0.071	0.297	-0.231	1
	Correlation					
	P	0.882	0.647	0.050	0.132	
	N	44	44	44	44	44



Фиг. №13 Корелация между нивата на β2-МГ и NGAL



Фиг. №14 Корелация между албуминурията и протеинурията при пациентите с β -ТМ

4.7. Корелационен анализ между нивата на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL, NAG и eGFR на пациенти с β -ТМ.

Табл.№ 24 Корелация на Pearson

		eGFR	NGAL/ креатинин	NAG/ креатинин	β 2-МГ/ креатинин
eGFR	Pearson Correlation	1	-0.012	-0.265	0.122
	P		0.936	0.082	0.431
	N	44	44	44	44
NGAL/ креатинин	Pearson Correlation	-0.012	1	-0.011	0.297
	P	0.936		0.944	0.050
	N	44	44	44	44
NAG/ креатинин	Pearson Correlation	-0.265	-0.011	1	-0.231
	P	0.082	0.944		0.132
	N	44	44	44	44
β 2-МГ/ креатинин	Pearson Correlation	0.122	0.297	-0.231	1
	P	0.431	0.050	0.132	
	• N	44	44	44	44

Сравнихме eGFR и стойностите на β 2-микроглобулин, NGAL и NAG при изследваните пациенти. От направения анализ не се установи корелация между eGFR и нивата на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL и NAG при пациентите с β -ТМ.(табл.

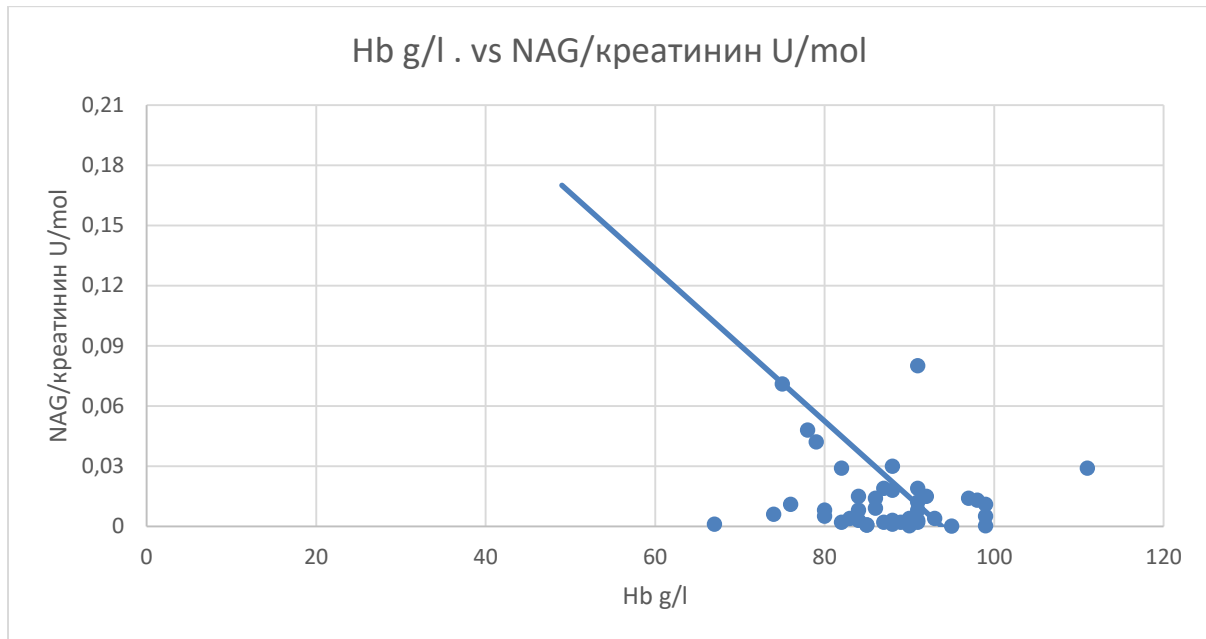
4.8. Корелационен анализ между нивата на β 2-микроглобулин, NGAL, NAG и претрансфузионните нива на хемоглобина и феритина на пациенти с β -ТМ

Табл.№ 25 Корелация на Pearson за изследваните показатели

		NGAL/ креатинин	NAG/ креатинин	β 2-МГ/ креатинин	Нб
NGAL/ креатинин	Pearson Correlation	1	-0.011	0.297	0.009
	P		0.944	0.050	0.955
	N	44	44	44	44
NAG/ креатинин	Pearson Correlation	-0.011	1	-0.231	-0.529
	P	0.944		0.132	0.0001
	N	44	44	44	44
β 2-МГ/ креатинин		0.297	-0.231	1	-0.390
		0.050	0.132		0.09
	N	44	44	44	44
Нб	Pearson Correlation	0.009	-0.529	0.390	1
	Pearson Correlation	0.955	0.0001	0.009	
	P	44	44	44	44

Сравнихме претрансфузионните стойности на хемоглобина и нивата на β 2-микроглобулин, NGAL и NAG.(табл. 25)

Откри се отрицателна корелация между Hb и NAG, ($r=-0.529$) $p=0.0001$) като я представяме графично.(фиг.15)



Фиг. №15 Корелация между стойностите на Hb и NAG

Анализът показва, че с намаляване на претрансфузионните нива на хемоглобина нарастват стойностите на NAG.

Табл.№ 26 Корелация на Pearson на изследваните показатели

		NGAL/ креатинин	NAG/ креатинин	β2-МГ/ креатинин	Феритин
NGAL/ креатинин	Pearson Correlation	1	-0.011	0.297	-0.053
	P		0.944	0.050	0.730
	N	44	44	44	44
NAG/ креатинин	Pearson Correlation	-0.011	1	-0.231	-0.194
	P	0.944		0.132	0.206
	N	44	44	44	44
β2-МГ/ креатинин	Pearson Correlation	0.297	-0.231	1	0.095
	P	0.050	0.132		0.540
	N	44	44	44	44
феритин	Pearson Correlation	-0.053	-0.194	0.095	1
	P	0.730	0.206	0.540	
	N	44	44	44	44

Сравнихме стойностите на феритина и нивата на β2-микроглобулин, NGAL и NAG

Не се установи корелация между феритина и изследваните параметри NGAL, NAG, β2-МГ при пациентите с β-ТМ.

4.9. Корелационен анализ между стойностите на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL и NAG на пациентите с β -ТМ и продължителността на хелатиращото и хемотрансфузионното лечение.

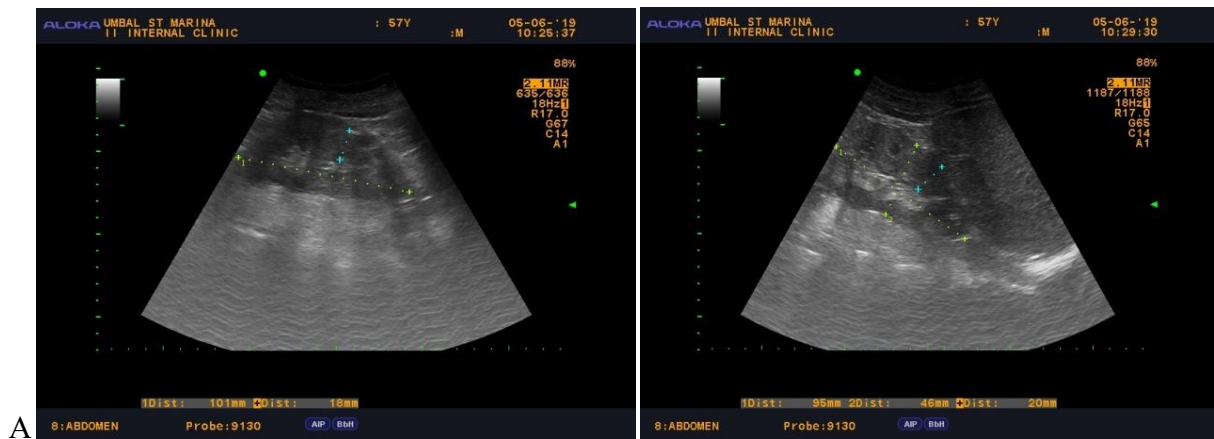
Табл. №27 Корелация на Pearson

Вид лечение		β 2- микроглобулин	NGAL/креатинин	NAG/ креатинин
Хелатиращо лечение	Pearson Correlation	0,217	0,046	-0,085
	p	0,162	0,771	0,586
	N	43	43	43
Хемотрансфузионно лечение	Pearson Correlation	0,242	0,137	-0,150
	p	0,114	0,375	0,331
	N	44	44	44

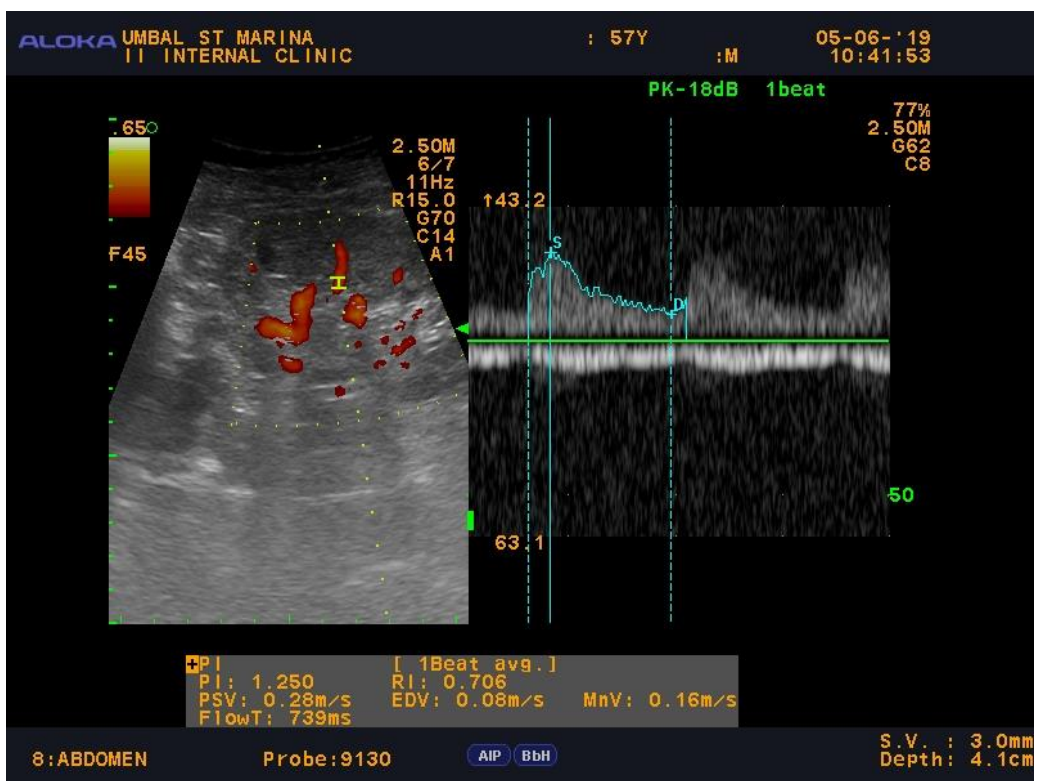
От направения анализ не се установи корелация между продължителността на хелатиращото и хемотрансфузионното лечение и нивата на уринните маркери β 2-микроглобулин, NGAL и NAG при изследваните пациенти. (табл. 27)

4.10. Сравнителен анализ на импедансните Доплер индекси/ RI и PI/ на пациенти с β -ТМ и контролна група

Чрез В-mode скениране установихме при пациентите с β -ТМ ехографски белези за дифузен паренхимен процес на бъбреците, уплътнен паренхим I-II степен, със заличено кортико-медуларно свързване. Чрез Пулсов Доплер изследвахме импедансните индекси RI и PI на интерлобарни артерии на двата бъбрека при пациенти и контроли. Извършихме най-малко по три измервания на RI и PI на двата бъбрека на всеки един от участниците в проучването, като установихме тяхната средна аритметична стойност и стандартното отклонение. (фиг. 16, фиг. 17, фиг. 18)



A

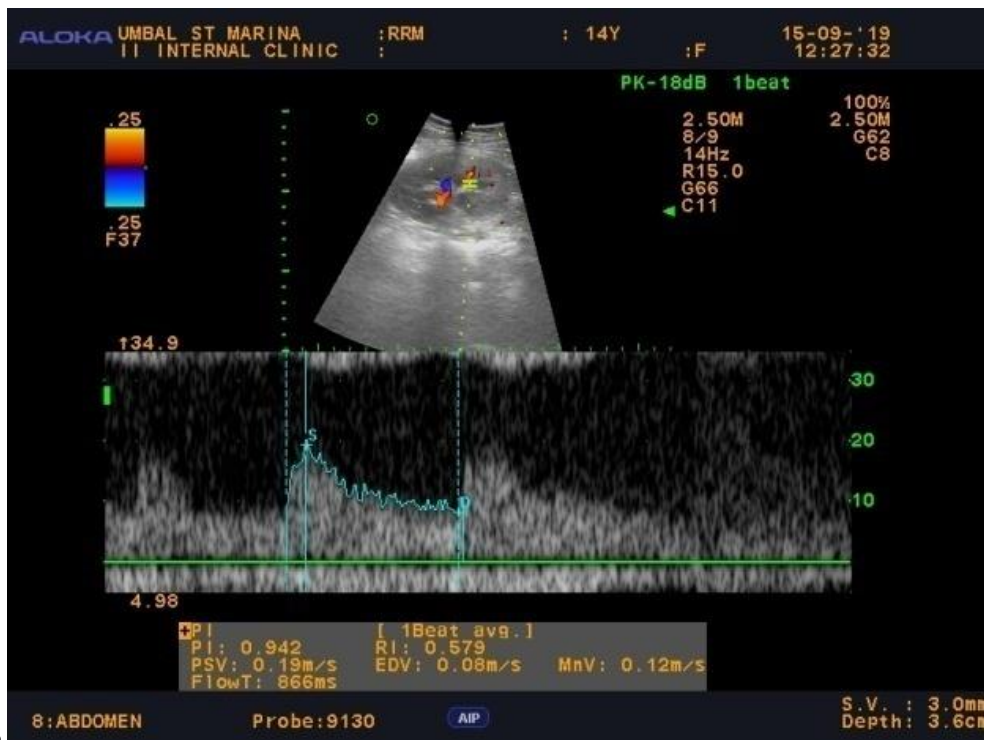


B

Фиг.№16 Т.А.Х на 57 години с β -ТМ (А)В-mode Бъбреци двустранно с нормални размери, уплътнен паренхим II степен, заличено кортико-медуларно свързване; (B) Pulse Doppler RI-0,70; PI-1,25



A



B

Фиг. №17 Р.Р.М. здрава контрола на 14 години

(A) B-mode-скениране на бъбрек- нормална ехогенност на паренхимата

(B) Pulse Doppler RI-0,57; PI-0,94



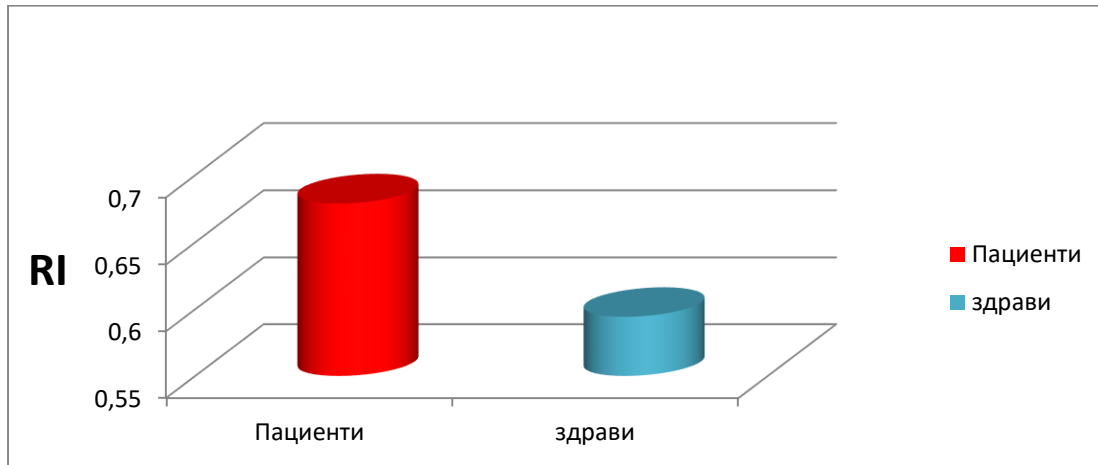
A



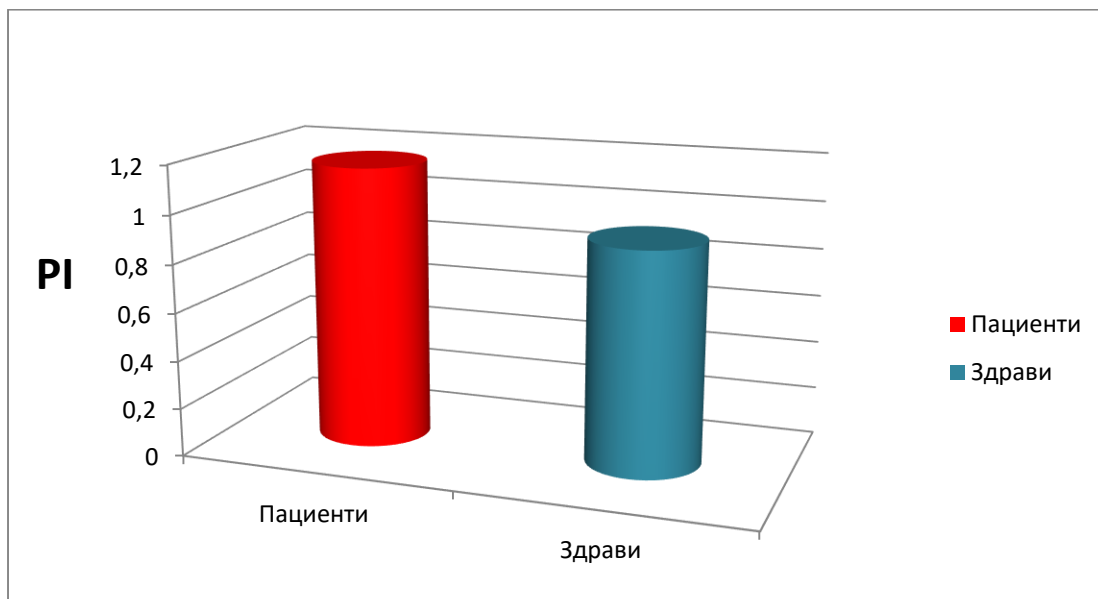
B

Фиг.№18 Л.И.М. на 11 години с β -ТМ.(А) В-mode-скениране на бъбрек- повишена ехогенност на паренхим I-II степен, подчертани медуларни зони, заличено кортико-медуларно свързване;(В) Pulse Doppler RI-0,61; PI-0,96

Чрез дескриптивен анализ определихме и сравнихме средните стойности на RI и PI и стандартното отклонение на пациенти (RI - $0,6789 \pm 0,05091$; PI - $1,1655 \pm 0,18242$) и здравите контроли (RI - $0,5943 \pm 0,04493$; PI - $0,9197 \pm 0,122915$) и ги представихме в графики (фиг.19,20)



Фиг.№19 Сравнение на RI при пациенти и здрави контроли.



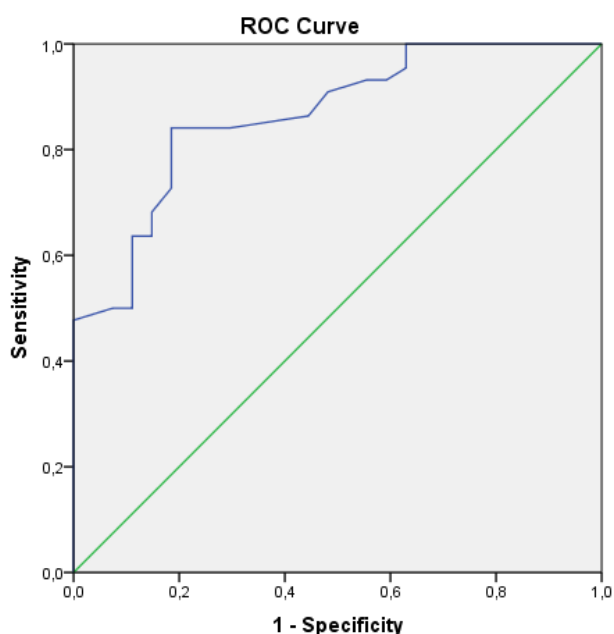
Фиг. №20 Сравнение на PI при пациенти и здрави контроли

Чрез корелационен анализ установихме статистически значима разлика между пациенти и контроли при показателите RI ($U = -7,525$, $p = 0,0001$), PI ($U = -6,366$, $p = 0,0001$) (табл.28)

Табл. №28 Mann-Whitney U Test

Показател	Контроли	Болни	U test/ Z	P
RI	0,5943± 0,044	0,6789± 0,050	-7,525	0,0001
PI	0,9197± 0,129	1,1655±0,1824	-6,366	0,0001

Тествахме предиктивната роля на импедансните Доплер индекси / RI и PI/ като маркери за откриване на ранни нарушения в реналната хемодинамика.



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

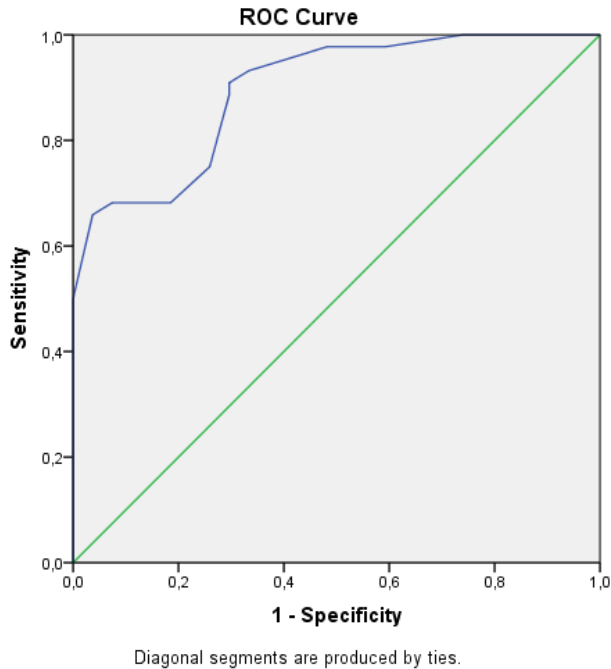
Test Result Variable(s): PI

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0,865	0,042	0,0001	0,782	0,948

Фиг.№ 21 ROC крива

Резултатът от ROC кривата на анализа показва, че площта под кривата е 0,865, т.е. 86,5% от бъбречната увреда може да бъде предвидена от маркера / PI –p = 0,0001, CI – 95% / 0,782-0,948/. Резултатите показаха, стойностите на PI около 0,99 имат

84,1% специфичност и 18,5% чувствителност. Стойностите над 0,99 за RI намаляват чувствителността на маркера и се считат за по-малко надеждни по отношение на диагностиката на нарушенията в бъбречната хемодинамика(фиг. 21, фиг. 22)



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): RI

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0,895	0,036	0,000	0,824	0,966

Фиг.№ 22 ROC крива

Резултатът от ROC кривата показва, площта под кривата е 0,0895, т.е. 89,5% от бъбречната увреда може да бъде предвидена от маркера /RI – $p < 0,0001$, CI-95% /0,0824 - 0,9668/. Резистивният индекс е по – надежден показател от пулсативния индекс. Резултатите от анализа съответстват на установените в научната практика, че резистивният индекс е по-показателен маркер за настъпване на увреда в хемодинамиката в сравнение с пулсативния индекс.(Григоров Н.)Резултатите показват, че стойностите на RI между 0,63 – 0,64 имат 70-75 % чувствителност и 20-25 % специфичност. Стойностите над 0,645 намаляват специфичността и чувствителността на маркера.

Табл. № 29 Корелация на Pearson

		RI	PI
албумин/креат	Pearson Correlation	-0.100	-0.053
	p	0.520	0.730
	N	44	44
протеин/креатинин	Pearson Correlation	-0.164	-0.135
	p	0.288	0.382
	N	44	44
NGAL/креатинин	Pearson Correlation	0.102	0.169
	p	0.508	0.273
	N	44	44
NAG/креатинин	Pearson Correlation	-0.026	-0.026
	p	0.869	0.867
	N	44	44
β 2-МГ/креатинин	Pearson Correlation	0.111	0.109
	p	0.475	0.480
	N	44	44

Сравнихме стойностите на RI и PI с нивата на уропротеините β 2-МГ, NGAL, NAG.(табл.29) Не установихме корелация между импедансните Доплер индекси(RI и PI) и уринните маркери за ранно бъбречно увреждане β 2-МГ, NGAL, NAG при пациентите с β -ТМ

Извършихме сравнителен анализ между NGAL/креатинин, NAG/креатинин, β 2-МГ/креатинин и алб./креатинин и протеин/креатинин отношения.(табл. 30)

Табл. №30 Корелация на Pearson

		албумин/ креатинин	протеин/ креатинин	NGAL/ креатинин	NAG/ креатинин	β2-МГ/ креатинин
албумин/ креатинин	Pearson	1	0.947	-0.073	-0.047	0.023
	Correlation					
	P		0.0001	0.636	0.761	0.882
	N	44	44	44	44	44
протеин/ креатинин	Pearson	0.947	1	-0.086	0.026	-0.071
	Correlation					
	P	0.0001		0.580	0.868	0.647
	N	44	44	44	44	44
NGAL/креатинин	Pearson	-0.073	-0.086	1	-0.011	0.297
	Correlation					
	P	0.636	0.580		0.944	0.050
	N	44	44	44	44	44
NAG/креатинин	Pearson	-0.047	0.026	-0.011	1	-0.231
	Correlation					
	P	0.761	0.868	0.944		0.132
	N	44	44	44	44	44
β2-МГ/креатинин	Pearson	0.023	-0.071	0.297	-0.231	1
	Correlation					
	P	0.882	0.647	0.050	0.132	
	N	44	44	44	44	44

Не се установи корелация между NGAL/креатинин, NAG/креатинин, β2-МГ/креатинин и алб./креатинин отношенията при пациентите с β-ТМ. Няма корелация между NGAL/креатинин, NAG/креатинин, β2-МГ/креатинин и протеин/креатинин при пациентите с β-ТМ. (табл.30)

Извършихме сравнителен анализ между NGAL/креатинин, NAG/креатинин, β2-МГ/креатинин и eGFR.(табл.№31)

Табл.№ 31 Корелация на Pearson

		eGFR	NGAL/ креатинин	NAG/ креатинин	β2-МГ/ креатинин
eGFR	Pearson Correlation	1	-0.012	-0.265	0.122
	P		0.936	0.082	0.431
	N	44	44	44	44
NGAL/ креатинин	Pearson Correlation	-0.012	1	-0.011	0.297
	P	0.936		0.944	0.050
	N	44	44	44	44
NAG/ креатинин	Pearson Correlation	-0.265	-0.011	1	-0.231
	P	0.082	0.944		0.132
	N	44	44	44	44
β2-МГ/ креатинин	Pearson Correlation	0.122	0.297	-0.231	1
	P	0.431	0.050	0.132	
	N	44	44	44	44

Не се доказа корелация между посочените отношения и eGFR при пациентите с β-ТМ

5. ОБСЪЖДАНЕ

За първи път в България се провежда цялостно проучване върху бъбречната патология при болните с β-ТМ и по-специално върху тубулните нарушения. Нашата цел е , да се направи анализ на съвременните уринни биомаркери за ренална дисфункция и да се определи тяхната предиктивна стойност за настъпване на ранна бъбречна увреда при тези пациенти. При определяне на показател за бъбречно увреждане се ръководихме от препоръките на Американския здравен институт за избор на биомаркер. Изследвахме съвременни, неинвазивни, уринни маркери, високо чувствителни и специфични, които дават допълнителна информация за тубулопатиите при пациентите с β-ТМ. Много изследователи са включили в своите проучвания протеини и ензими, отнесен към креатинин в първа сутрешна урина като β2 – МГ,

NGAL, NAG, L-FABP, KIM, RBP, които се асоциират с тубулопатии. Ние избрахме уропротеините и ензимите- $\beta 2$ – МГ, NGAL, NAG за нашето проучване, защото очакванията ни са да докажем много ранни увреждания на проксималния тубул, още преди да се е появила албуминурията и протеинурията при пациентите с β -ТМ. Известно е, че таласемиите са редки заболявания, като за нашата страна честотата на β -ТМ е 2,5-3,0 %. (Йорданова В. и съавт., 2018г.) Бъбречните увреждания не са чести при това заболяване, затова се определиха няколко маркера, за да получим по-пълна информация за тубулопатиите при тази група болни.

Нашите резултати потвърждават тези в световната литература, отчитащи сигнификантно високи нива на уринен NGAL при пациентите с β -ТМ (Velat S. et al 2013-2014). Клинични проучвания и студии публикуват доказателства за предиктивна роля на NGAL за настъпване на ОБУ при политравматизъм, сепсис, оперативни интервенции; приложение на нефротоксични медикаменти и вещества. (Mishra J et al, 2006) Той е ранен маркер за прогресия на диабетната нефропатия. A. Lacquaniti et al през 2013 г. доказват сигнификантно завишени стойности на уринен NGAL при нормоалбуминурични пациенти със захарен диабет. Тези данни определят NGAL като надежден маркер в диагностиката на бъбречната увреда и нейната прогресия.

Двата маркера- $\beta 2$ -МГ и NGAL - се откриват в нищожни количества при урината на здравите индивиди. Тяхната детекция свидетелства за много ранни тубулни увреждания. При уринния $\beta 2$ -МГ въпреки видимите различия в двете групи- $2,5310 \pm 2,1676 \text{ mg/ml}$ при здрави контроли и $3,393 \pm 2,7238 \text{ mg/ml}$ при пациенти, Mann-WhitneyU тестът не показва сигнификантна разлика. Вероятна причина за липсата на статистическа значимост е ограничени брой пациенти, участници в проучването (N=44). Друга причина може да бъде фактът, че ние не сме обхванали пациентите с β -ТМ от цялата страна. Уринният $\beta 2$ -МГ е удобен за прилагане в клиничната практика, поради по-ниската си цена от останалите маркери за ранно бъбречно увреждане като NGAL и NAG. Установяване на предиктивност на $\beta 2$ -МГ в урина може да го превърне в обещаващ, неинвазивен маркер за ренална дисфункция при пациентите с β -ТМ.

В много проучвания за тубулната функция на пациентите с β -ТМ е доказана повишена екскреция на NAG. (Liangos O et al, 2007; Adiyanti S et al, 2012) В нашето изследване нивата на NAG са незначително завишени, спрямо тези на здравите контроли. Не се установи статистически значима разлика при този показател.

Доказахме положителна корелационна връзка между $\beta 2$ -МГ и NGAL. Тези два маркера свидетелстват за много ранни увреждания в проксималния тубул, когато е нарушена тубулната реабсорбция на разтворимите вещества. NAG се явява малко по-късен показател в диагностиката на тубулопатии. Откриването му в урината е доказателство за лизис на клетката. В този смисъл установихме много ранни нарушения в тубулната функция при болните с β -ТМ, още преди да е настъпила клетъчната смърт.

Направихме характеристика на бъбречната функция на пациентите с β -ТМ като изследвахме урея, серумен креатинин, eGFR по формулите Schwartz за деца и MDRD за възрастни, отношенията албумин/креатинин, протеин/креатинин в първа сутрешна урина. Нашите резултати потвърдиха документираните данни в други проучвания, че болните β -ТМ имат хиперфилтрация (средна стойност на eGFR-151,25 ml/min \pm 41,18880 SD), която нараства с възрастта. В литературата няма точно определена с-ст на eGFR, над която се появява хиперфилтрацията. Gokse et al отчитат гломерулната хиперфилтрация при eGFR>165 мл/мин. Според Malaki M. et al, тя настъпва при eGFR>130 мл./мин., а ние приехме за хиперфилтрация стойности на eGFR>120 мл./мин.

Хиперфилтрацията настъпва по-рано при болните β -ТМ, отколкото при останалите пациенти / захарен диабет, затлъстяване/във връзка с тежката анемия и повишения бъбречен плазмоток. Нашите резултати потвърдиха тези на Malaki M. et al., че eGFR положително корелира с възрастта на пациентите с β -ТМ, т.е. с продължителността на заболяването. В такъв аспект хиперфилтрацията при пациентите с хронична анемия трябва да се разглежда като мощен увреждащ фактор за клетката, респ. нефрона.

Доказахме положителна корелативна връзка между eGFR и стойностите на феритина при изследваните пациенти с β -ТМ. Феритинът корелира с нивото на свободното желязо в организма.

Международната федерация по таласемии приема, че при стойности на феритина под 2500 mg/l рискът от сърдечно заболяване и смърт е по-нисък, а поддържането на феритина под 1000 mg/l може да бъде свързано с клинични ползи. Нарастването на феритина предполага повишаване на желязния свръхтовар, но може да се касае и за възпаление, което изисква клинична преценка.

Изследвахме албуминурията и протеинурията при болните на лечение с Ferriprox, Exjade, Desferal и комбинация от хелаторните медикаменти. Нашите резултати потвърдиха тези в медицинската литература за поява на протеинурия при лечение с препарата Exjade. (Bhandari S et al, 2012; Ponticelli C et al, 2010). Намаляване на дозата или прекъсване на терапията с Exjade може също да се има предвид, ако се установят отклонения в показателите на бъбречната тубулна функция – протеинурия, глюкозурия при пациенти без захарен диабет, ниски нива на калий, фосфати, магнезий, урати в серума, наличие на фосфатурия и аминокиселинурия. Установихме ниски нива на албуминурията и протеинурията при пациентите на комбинирано лечение с Ferriprox и Desferal. Известно е, че и двата препарата не са нефротоксични, като комбинацията от Ferriprox и Desferal, приложена при нашите пациенти е най-щадяща за бъбрека.

Сравнихме нивата на албумин/креатинин, протеин/креатинин с β 2-МГ/креатинин, NGAL/креатинин, NAG/креатинин на болните с β -ТМ. Ние не открихме корелация между уропротеините - β 2-МГ, NGAL, NAG и албуминурията и протеинурията при изследваните пациенти, но установихме положителна корелативна връзка между ACR и PCR ($r = 0.947$). Ние установихме при пациентите с β -ТМ гломерулна и тубулна протеинурия, както и положителна корелация между тях. Нашите резултати потвърдиха данните в световната научна литература, че при β -Таласемия Майор, нефронът се уврежда на ниво гломерул и тубул. (Mallat N., 2013)

Извършихме сравнителен анализ между стойностите на β 2-МГ, NGAL, NAG, отнесени към креатинин в първа сутрешна урина и eGFR при пациентите с β -ТМ. Не установихме корелация между посочените уропротеини и степента на гломерулната филтрация.

Сравнихме отношенията β 2-МГ/креатинин, NGAL/креатинин, NAG/креатинин с феритина и претрансфузионните нива на хемоглобина. Не установихме връзка между изследваните маркери в урина и нивата на феритина при болните, участващи в проучването ни. Доказахме корелация между NAG и претрансфузионните нива на хемоглобина, която е силна и отрицателна ($r = -0.529$, $p = 0.0001$). Стойностите на NAG нарастват с тежестта на анемията.

Нашите резултати не потвърдиха установените в научната литература данни за положителна корелация между уринните маркери за ранно бъбречно увреждане и

продължителността на хемотрансфузионно и хелатиращо лечение при тази група болни.(MohkamM.et al, 2008)

Чрез Доплер ехография изследвахме периферното съдово съпротивление , като измерихме импедансите индекси(RI и PI) на интерлобарни артерии на пациенти и контроли. До сега не е извършвано проучване върху бъбречната хемодинамика при пациентите с таласемии в България. В световната научна литература са публикувани данни за ролята на бъбречната Доплер ехография и по-специално RI и PI в диагностиката на интравеналните съдови промени при болните със сърповидноклетъчна анемия. Стоянова Е. et al описват нарушенията в микроциркулацията при експериментален модел хомозиготни β –таласемични мишки като измерват индекса на Pourcelot - индекс на резистентност на ниво каротидни артерии и абдоминална аорта при таласемичните модели мишки. Установяват завишени стойности на Pourcelot индекса(0,867) на каротидни артерии и (0,822) на абдоминална аорта и доказват повишено съдово съпротивление при артерии на главата, врата, коремни органи и долни крайници при хомозиготни β –таласемични мишки. В много студии е посочена нормална средна стойност на RI около $0,64 \pm 0,05$, а за горна граница 0,70. Ние установихме видими различия в стойностите на RI и PI при пациенти и контроли и открихме статически значима разлика за RI($p=0,0001$) и за PI($p=0,0001$). Доказахме, че RI е по-високо специфичен и сензитивен маркер в диагностиката на бъбречната увреда от PI при пациентите с β -ТМ. Нашите резултати потвърдиха установенните в научната практика, че RI е по-надежден маркер за оценка и проследяване на дифузните паренхимни заболявания.(Григоров Н. 2010, Кундурджиев А. 2019). Резистивният индекс е удобен за изследване, тъй като не зависи така силно от ъгъла на разпространение на ултразвуковите вълни, което е особено важно за абдоминалните съдове, които се изобразяват по-трудно и само в определени срезове.

Сравнявайки контроли и пациенти ние установихме статистически значима разлика при NGAL/креатинин, албумин/креатинин, протеин/креатинин, RI и PI, от където можем да обобщим, че тези параметри са обещаващи показатели за ренална дисфункция при пациентите с β -ТМ.Статистическият анализ на получените резултати от изследванията на уринен NGAL при болните, участници в проучването показваха сигнификантно високи резултати, в сравнение с резултатите за този параметър при контролната група. Изследването на уринния NGAL се оказва надежден, неинвазивен метод за ранна диагностика на бъбречната увреда и евентуалната ѝ прогресия при пациентите с β -ТМ.

Резултатите от нашия анализ за предиктивната роля на съвременните уринни ензимни маркери за ранно бъбречно увреждане не показаха положителна корелационна зависимост. Това може да се дължи както на сложната преданалитика на уринния анализ, така и на факта, че ние използвахме имунологични (количествени) тестове за определяне на ензими в урината, а не кинетични, показващи активността на ензим-субстратната реакция. Определянето на ензими (като активност) в урината показва на субклетъчно равнище увредата на проксималния тубул.

Познаването на патофизиологията на тубулните увреждания при пациентите с β -ТМ и тяхното доказване по неинвазивен път, ще даде по-големи възможности на клиницистите да диагностицират и прогнозируют настъпването на ранна бъбречна увреда, да въздействат с нови терапевтични схеми в началните етапи на болестния процес.

6. ИЗВОДИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. За първи път в България се изследват уринните маркери за тубулна дисфункция β 2-МГ, NGAL и NAG при пациентите с β -ТМ и се установява статистически значима разлика при NGAL спрямо контролната група .

2. За първи път се прави оценка на реналната хемодинамика при пациентите с β -ТМ и се установява статистически значима разлика при импедансните - Доплер индекси (RI и PI) спрямо контролите.

3. За първи път се доказва, че RI и PI притежават висока чувствителност - над 80%, като RI е с по-висока предиктивна способност спрямо PI при пациентите с β -ТМ

ИЗВОДИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

1. Потвърди се, че пациентите с β -ТМ имат хиперфилтрация , съответстваща на хронично бъбречно заболяване – стадий G1- G2.

2. Доказа се, че при пациентите с β -ТМ с увеличаване на възрастта , нараства eGFR и се повишават албуминурията и протеинурията.

3. Потвърди се, че пациентите лекувани с препарата Exjade имат регистрирана най-висока протеинурия, спрямо пациентите на терапия с другите хелаторни средства.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болните с β -ТМ се отличават с коморбидност. Бъбречното засягане е само едно от проявите на заболяването. Ние изследвахме тубулопатиите при тази група пациенти, като използвахме съвременни неинвазивни уринни маркери за ранна бъбречна увреда.

Известно е, че традиционните маркери за ренална дисфункция като серумен креатинин и урея, които се прилагат рутинно в практиката не могат да дадат ранна и прецизна диагноза на бъбречната увреда.

С помощта на съвременните неинвазивни уринни маркери за ранно бъбречно увреждане ние открихме много ранни нарушения в тубулната функция при болните с β -ТМ. Установихме видими различия в стойностите на β 2-МГ и NGAL при пациенти и контроли и доказахме статистическа значимост при уринния маркер NGAL.

Уринният NGAL е ранен показател за тубулопатии не само при хемотрансфузионно зависимите анемии, но и маркер за бъбречното ангажиране в хода на остри и хронично протичащи заболявания.

Доказахме, че болните с β -ТМ имат хиперфилтрация и ХБЗ стадий G1- G2. (KDIGO 2012г.) Установихме статистическа значима разлика при албинурията и протеинурия при пациенти и контроли. Хиперфилтрацията и албинурията са два независими рискови фактори за настъпване и прогресия на ХБЗ. Нашите резултати потвърдиха установените в медицинската практика данни за нарастване на протеинурията при болните, провеждащи лечение с препарата Exjade (Deferasirox).

Подчертахме значението на бъбречната Доплер- ехография в диагностиката на интратеналните хемодинамични нарушения при болните с β -ТМ и дадохме препоръки за рутинно използване на RI при проследяване на дифузните паренхимни процеси в бъбреците.

Ензимният уринен анализ все още не е достатъчно унифициран и стандартизиран, като се влияе от много преданалитични и аналитични фактори, които засега ограничават клиничното му приложение. Стандартизирането на преданалитичния етап, използването на адекватни кинетични тестове за ензими в урината и натрупването на теоритичен и клиничен опит, ще разширят сферата на неговото използване в диагностиката и прогнозата на този род заболявания.

Това прави актуално изследването на бъбречните тубулни ензими, които имат добри перспективи за оценка на тубуло-интерстициалните промени при пациентите с ХБЗ.

8. ПРИНОСИ

1. За първи път в България се извършва проучване върху тубулната функция на пациентите с β -ТМ и се установяват ранни тубулни нарушения.

2. За първи път в нашата страна се прави анализ и проследяване чрез Доплер - ехография на реналната хемодинамика при пациентите с β -ТМ.

3. В България за първи се изследват маркерите за периферно съдово съпротивление и ендотелна дисфункция RI и PI при пациентите с β -ТМ, като се установява статистически значима разлика спрямо контролната група.

9. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. NGAL / неутрофилен гелатиназа-асоцииран липокалин /- биомаркер за ранно бъбречно увреждане и прогресия на ХБЗ. **Лилия Стоянова**, Светла Стайкова, Мария Димова, Елена Маринова, сп. Наука Кардиология, бр. 3/2018 г. стр. 103-106;

2. Нови уринни биомаркери за установяване на ранно бъбречно увреждане при болни с бета - Таласемия майор. **Лилия Стоянова**, Светла Стайкова, Валерия Калева, Мария Димова, Елена Маринова, сп. Нефрология, диализа и трансплантация, бр. 2/2018 г., стр. 22-28;

3. Абдоминална ехография при болни с бета - Таласемия майор. **Лилия Стоянова**, Светла Стайкова, сп. Нефрология, диализа и трансплантация, бр. 2/2018 г., стр. 39-43;

4. Ренална дисфункция при болни с β -Таласемия майор.**Л. Стоянова**, Св. Стайкова, В. Калева, М. Димова, сп. Хематология, 2019г, том XLV, бр. 1-

5. Нефрологични аспекти при пациенти с таласемии - **Л. Стоянова**, доклад, **Национална конференция по нефрология**, Албена 2018 г.;

6. Биомаркери за ранно бъбречно увреждане при бета-Таласемия майор-постер, **Л. Стоянова**, , **Национална конференция по нефрология**, Албена 2018 г.