



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ**

д-р Севим Ахмед Шефкет

**ПРЕДИКТИВНА РОЛЯ НА NGAL КАТО РАНЕН МАРКЕР ЗА
БЪБРЕЧНО УВРЕЖДАНЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗД ТИП I и ЗД ТИП II**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Специалност „Клинична лаборатория“

Научен ръководител – Доц. д-р Яна Бочева, д.м.

Варна, 2022 г.

Научно жури:

Проф. д-р Аделаида Лазарова Русева, д.м.

Доц. д-р Мариянка Генова Петрова-Яначкова, д.м.

Доц. д-р Таня Иванова Денева, д.м.

Проф. д-р Виолета Михова Йотова, д.м.

Доц. д-р Даниела Иванова Герова, д.м.

Резервни членове:

Проф. д-р Димитричка Дучева Близнакова, д.м.

Доц. д-р Дора Терзиева, д.м.

Дисертационният труд съдържа общо 150 страници, онагледени с 36 фигури и 47 таблици. Библиографията съдържа 221 литературни източника, от тях 10 на кирилица и 211 на латиница.

Проучването и лабораторният анализ са извършени в МДЛ „Клинична лаборатория“ към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.

Докторантът работи в МДЛ „Клинична лаборатория“ към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, и заема длъжност „асистент“ в Катедра по клинична лаборатория към МУ „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна. Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен за защита пред научно жури от Катедрен съвет № 9, Катедра по клинична лаборатория към МУ „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна на 18.02.2022 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 13.05 2022 г.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ - Варна и са публикувани на интернет страницата на Медицински университет - Варна.

Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ:

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	6
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	12
1. Верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL	12
2. Референтни граници на NGAL при възрастни лица. Биологична вариация.....	14
3. Референтни граници на NGAL при деца. Биологична вариация	17
4. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ при ЗД II.....	19
4.1. pNGAL като маркер за диагноза на ДБЗ при пациенти със ЗД II.....	21
4.2. uNGAL и UNC като маркери за диагноза на ДБЗ при пациенти със ЗД II	23
5. Диагностична надеждност на NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ при ЗД II.....	33
6. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ при ЗД I	39
6.1. pNGAL като маркер за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД I	41
6.2. uNGAL и UNC като маркери за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД I	43
V. ДИСКУСИЯ.....	49
1. Верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL	49
2. Референтни граници на NGAL. Биологична вариация	51
2.1. Референтни граници на NGAL при възрастни. Биологична вариация.....	51
2.2. Референтни граници на NGAL при деца. Биологична вариация	56
3. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ	58
3.1. NGAL като маркер за диагноза на ДБЗ при пациенти със ЗД II.....	58
3.2. NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД II.....	68
3.3. NGAL маркер за диагноза и прогноза на ДБЗ при пациенти със ЗД I.....	70
VI. ИЗВОДИ.....	77
VII. ПРИНОСИ	79
VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	80
БЛАГОДАРНОСТИ	80

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДБЗ – Диабетно бъбречно заболяване

ДН – Диабетна нефропатия

ЗД – Захарен диабет

ИПП – Инфекции на пикочните пътища

ССЗ – Сърдечно-съдово заболяване

ТБН – Терминална бъбречна недостатъчност

ХБЗ – Хронично бъбречно заболяване

ACR – uAlbumin/uCreatinine ratio

ADA – American Diabetes Association

AER – Albumin excretion rate

BMI – Body mass index

CKD-EPI – Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

CV – Coefficient of variation

GFR – Glomerular filtration rate

ID-MS – Isotopic dilution mass spectrometry

IQR - Interquartile Range

KIM-1 – Kidney Injury Molecule-1

LCN-2 – Lipocalin-2

LLOD – Lower limit of detection

LLOQ – Lower limit of quantification

MDRD – Modification of Diet in Renal Disease

NGAL – Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

PETIA – Particle-Enhanced Turbidimetric Immunoassays

SD – Standard deviation

ULOQ – Upper limit of quantitation

UNC – uNGAL/uCreatinine ratio

WHO – World Health Organization

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет (ЗД) е социално значимо заболяване с нарастваща честота, която достига епидемични размери. Едно от основните и сериозни усложнения на ЗД е диабетното бъбречно заболяване (ДБЗ), което се асоциира с повишена сърдечно-съдова заболеваемост (ССЗ) и риск от развитие на терминална бъбречна недостатъчност (ТБН). Ранното откриване и по-доброто управление на ДБЗ може да забавят прогресията му до ТБН и да предотвратят сърдечно-съдовите усложнения. Към момента скоростта на гломерулна филтрация и скоростта на албуминова екскреция или съотношение албумин/креатинин са основни критерии за диагноза, класификация и стратификация на риска на ДБЗ. Тези показатели демонстрират редица ограничения, което налага търсенето и валидирането на нови маркери в диагностиката на ДБЗ.

Диабетната нефропатия е заболяване, засягащо преимуществено гломерула, но редица проучвания посочват предиктивната роля на тубулоинтерстициалните лезии в развитието и прогресията на ДБЗ. Неутрофил гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) е един от най-обещаващите тубуларни биомаркери в диагностиката на бъбречните заболявания. NGAL е показател за бъбречно структурно увреждане, увеличените стойности на NGAL в плазма и урина индикират степента на субклинична тубулна увреда и се явяват по-ранни маркери за настъпването на бъбречна дисфункция от класическите гломерулни показатели. Данните в литературата посочват NGAL като маркер с добър диагностичен профил в диагностиката на ДБЗ. Стойностите на NGAL при пациенти със ЗД корелират с прогресията на албуминовата екскреция, със спада на скоростта на гломерулна филтрация, с тежестта на бъбречното увреждане и с риска от прогресия до ТБН. NGAL е определян като ранен маркер на ДБЗ, който констатира развитието на бъбречна дисфункция преди повишената албуминова екскреция. Въпреки това редица причини извън ДБЗ могат да индуцират повишена експресия на NGAL – затлъстяване, инсулинова резистентност и ЗД, ССЗ и инфекции на пикочните пътища. Всичко това показва необходимостта от допълнителни изследвания, за да се изясни предиктивната стойност на NGAL в диагностиката на ДБЗ, провокира нашия интерес и формира основанията за настоящото проучване.

За клиничната практика е подходящ имунотурбидиметричния тест за определяне на NGAL. За въвеждане на метода в рутинната практика е необходимо неговото верифициране и изграждане на методологично и възрастово зависими референтни граници за българската популация. За да се установи клинична приложимост на NGAL като маркер за бъбречно увреждане при ЗД, е необходимо да се оцени неговата диагностична надеждност и ефективността на методологично изведените cut-off стойности в разграничаването на пациентите с ДБЗ.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Да определим диагностичната надеждност на NGAL като маркер за ДБЗ при пациенти със ЗД I и ЗД II. В този контекст сме поставили конкретни задачи.

Задачи

1. Да въведем и верифицираме имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL на биохимичен анализатор ADVIA 1800.
2. Да определим възрастово и полово зависими референтни граници за българската популация на NGAL в плазма и урина, измерени чрез имунотурбидиметричен анализ.
3. Да оценим биологичната вариация на pNGAL, uNGAL и UNC в референтните групи.
4. Да определим диагностичната надеждност и клиничната приложимост на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД II.
5. Да определим диагностичната надеждност и клиничната приложимост на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД II.
6. Да определим диагностичната надеждност и клиничната приложимост на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД I.
7. Да определим диагностичната надеждност и клиничната приложимост на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД I.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Това проспективно проучване е проведено в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна за периода от 2019 – 2021 г. Протоколът за изследване е одобрен от Комисията по етика на научните изследвания към МУ – Варна. Всички участници в проучването са получили и попълнили протокол за информирано съгласие.

За въвеждането и верифицирането на латекс усилен имунотурбидиметричния анализ е използван реагентен кит, калибратори и контроли на фирма BioPorto Diagnostics A/S (Дания). Анализът е извършен на биохимичен анализатор ADVIA 1800. За построяването на 6-точкова калибрационна крива е използван калибрационният кит на производителя Bioporto. За верифициране на теста и за валидиране на аналитичните серии са използвани две нива контролен материал, в диагностично значими области от контролния кит на производителя.

За извеждането на референтни граници на NGAL в плазма и урина за българската популация е извършено научно изследване.

1. Обект на научното изследване – 127 здрави доброволци.
2. Предмет на научното изследване – определяне на референтни граници и оценка на биологичната вариация на NGAL в плазма и урина в българската популация.
3. Място на научното изследване – МДЛ „Клинична лаборатория“ към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Лабораторните изследвания са извършени в МДЛ „Клинична лаборатория“ към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.
4. Характер на наблюдението – проспективно проучване.
5. Дизайн на научното изследване – включени са 135 доброволци. Здравословното състояние на лицата в референтната група е оценено с помощта на анкетен метод и набор от лабораторни изследвания: кръвна картина, глюкоза, урея, креатинин, общ холестерол, триглицериди, полуколичествено изследване и седимент на урина, изчислен е eGFR. Резултатите от кръвната картина и от изследването на урината са използвани като изключващите критерии, а всички останали лабораторни параметри са включени в обработката на данните.

Приложени са следните критерии:

- 5.1. Включващи критерии: клинично здрави лица.
- 5.2. Изключващи критерии: анамнеза за остро или хронично бъбречно заболяване или друго системно заболяване с потенциален риск от вторично бъбречно засягане, злокачествени заболявания, системни или локални инфекции, артериална хипертония, тиреоидни заболявания, ревматологични заболявания, прием на медикаменти с нефротоксично действие или кортикостероидни препарати, бременност, констатирани повишени стойности на урея, креатинин, глюкоза, патологични промени в кръвната картина, патологична находка в урината, $eGFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. При 5-ма от възрастните доброволци и при 3 от децата са констатирани критерии за изключване.
- 5.3. Лицата, които покриват включващите критерии, са 127 и са разделени в групи:
 - 5.3.1. Референтна група от здрави лица > 18 г. – 85 здрави възрастни лица.
 - 5.3.2. Референтна група от здрави лица < 18 г. – 42 здрави деца.

За оценка на диагностичната надеждност на pNGAL, uNGAL и UNC като маркери за ДБЗ при пациенти със ЗД е извършено научно изследване с:

1. Обект на научното изследване – 167 пациенти със ЗД.
2. Предмет на научното изследване – оценка на диагностичната надеждност на NGAL като маркер за ДБЗ при пациенти със ЗД II и ЗД I.

3. Място на научното изследване – УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Лабораторните изследвания са извършени в МДЛ към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.
4. Характер на наблюдението – проспективно сравнително проучване.
5. Дизайн на научното изследване – в проучването са включени 177 пациенти със ЗД II и ЗД I. За оценка на здравословното състояние и за целите на клиничното проучване, при пациентите със ЗД са изследвани кръвна картина, креатинин, урея, общ холестерол, триглицериди, HDL-холестерол, LDL-холестерол, HbA1c, полуколичествено изследване и седимент на урина, креатинин и албумин в урина, изчислени са ACR, eGFR и BMI. Резултатите от кръвната картина и от изследването на урината са използвани като изключващите критерии, а всички останали лабораторни параметри са включени в обработката на данните.

Приложени са следните критерии:

- 5.1. Включващи критерии – пациенти с потвърдена диагноза ЗД тип I с давност над 5 години и пациенти с диагноза ЗД тип II, спрямо критериите на ADA и WHO.
- 5.2. Изключващи критерии – остри и хронични бъбречни заболявания извън ДБЗ, злокачествени заболявания, системни или локални инфекции, ревматологични заболявания, тиреоидни заболявания, прием на нефротоксични медикаменти или кортикостероидни препарати, бременност, левкоцитоза, наличие на левкоцитурия, $eGFR < 15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. При 7 от пациентите със ЗД II и при 3 от пациентите със ЗД I са констатирани критерии за изключване от научното изследване.
- 5.3. Пациентите, отговарящи на включващите критерии, са 167 и са разделени в 2 групи:
 - 5.3.1. Пациентска група от лица със ЗД II – 92-ма възрастни пациенти със ЗД II;
 - 5.3.2. Пациентска група от лица със ЗД I – 75 деца със ЗД I.
- 5.4. Класификация на групите пациенти – пациентите със ЗД I и ЗД II са разделени спрямо стойностите на ACR, eGFR, HbA1c и наличието на ДБЗ.
- 5.5. Информацията, получена от участниците в проучването, е съхранена в Катедрата по клинична лаборатория към МУ – Варна за срок от 5 години.

За определяне на NGAL и описаните лабораторни параметри е взета кръв при стандартизирани условия – сутрин на гладно (след 12 h хранителна пауза) и първа сутрешна урина. Използвани са следните биологични материали:

1. Пълна кръв – получена във вакутейнер с антикоагулант K₂EDTA, от който са изследвани кръвна картина и HbA1c.
2. Хепаринова плазма – получена във вакутейнер с антикоагулант литиев хепарин, центрофугирана за 15 минути на 2500 G. В хепаринова плазма са изследвани – pNGAL,

урей, креатинин, общ холестерол, HDL- и LDL-холестерол, триглицериди.

3. Първа сутрешна урина – в количество 20 ml. Извършено е полуколичествено химично изследване и е оценен седимент в урина. Количествените параметри в урината са определени след центрофугиране на урината за 15 мин. на 2500 G, в супернатанта са изследвани концентрация на uNGAL, креатинин и албумин.
4. Пробите са изследвани до два часа след получаване на биологичния материал за всички параметри освен за NGAL. Пробите за NGAL – плазма и урина, са прехвърлени в етикирани вакутейнери без адитив. Материалите са съхранени при -20°C до извършване на анализа, за период не по-дълъг от 3 месеца. Анализът на pNGAL и uNGAL е извършен поетапно след събиране на подходяща серия.

Методи

За верифициране на метода латекс усилен имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL на биохимичен анализатор ADVIA 1800, са оценени следните критерии за аналитична надеждност:

1. Извършена е проверка на калибрационната крива и проверка на аналитичния измервателен диапазон – LLOD (Limit of detection), LLOQ (Lower Limit of Quantification) и ULOQ (Upper Limit of Quantification).
2. Оценена е невъзпроизводимост в серия.
3. Оценена е невъзпроизводимост във време.
4. Оценена е аналитична откриваемост и е изчислен % recovery.
5. Определен е преносът на биологичен материал от проба в проба, чрез % Carryover.
6. Оценена е недостоверност и неточност.
7. Архивиране на резултатите. Резултати, получени в хода на изпитването, са систематизирани, обработени и съхранени в софтуерната програма на анализатора, в табличен вид на файлове EXCEL (Windows Office) и на хартиен носител.

За извеждане на референтни граници и за определяне на диагностичната надеждност на метода са използвани следните методи:

1. Анкетен метод. Преди получаването на биологични материал всички участниците в проучването са анкетираны от изследователя или от клиницисти (специалисти по ендокринология и детска ендокринология), което цели да установи наличието на критерии за включване в проучването.
2. Лабораторен анализ. Цитираните лабораторни тестове са извършени в Клинична лаборатория към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.
 - 2.1. NGAL в плазма и урина е изследван с латекс усилен имунотурбидиметричен анализ

- на биохимичен анализатор ADVIA 1800.
- 2.2. Съотношението UNC е калкулирано по формулата $uNGAL/uCreatinine \times 1000$, резултатите са представени в $\mu g/mmol$.
 - 2.3. Концентрацията на албумин в урина е оценена с имунотурбидиметричен анализ на биохимичен анализатор ADVIA 1800.
 - 2.4. ACR е калкулиран по формулата $AER/uCreatinine \times 1000 (g/mol)$.
 - 2.5. Креатинин в плазма и урина е изследван с Jaffe-кинетичен метод на анализатор ADVIA 1800, проследим до ID-MS.
 - 2.6. Урея в плазма е определена с двустъпен ензимен тест уреаза/UV спектрофотометрия на биохимичен анализатор ADVIA 1800.
 - 2.7. Общ холестерол е измерен с тристъпна ензимна реакция със завършек на Триндлер на биохимичен анализатор ADVIA 1800.
 - 2.8. Триглицериди са определени тристъпна ензимна реакция със завършек на Триндлер на биохимичен анализатор ADVIA 1800.
 - 2.9. HDL-холестерол е определен с директен ензимен метод с елиминация/катализа на биохимичен анализатор ADVIA 1800.
 - 2.10. LDL-холестерол е изчислен по формулата на Friedewald при стойност на триглицеридите $< 4.5 \text{ mmol/L}$ – $LDL\text{-chol} = TChol - (HDL\text{-chol} + TG/2.2)$. При стойност на триглицеридите $> 4.5 \text{ mmol/L}$, LDL-холестерол е измерен с директен ензимен метод с елиминация/катализа на биохимичен анализатор ADVIA 1800.
 - 2.11. HbA1c е определен с метод, стандартизиран съгласно DCCT/NGSP, на биохимичен анализатор ADVIA 1800. Резултатите са представени в %, изчислен от съотношението HbA1c/Total Hemoglobin (THb). HbA1c е измерен чрез турбидиметричен имуноанализ. THb е измерен чрез колориметричен метод
 - 2.12. Кръвна картина. Показателите от кръвната картина са определени на 5-diff хематологичен анализатор Sysmex XN 1000, използващ принципите на флуоресцентна поточна цитометрия с използване на полупроводников лазер и хидродинамично фокусиране.
 - 2.13. Полуколичествено химично изследване на урина и седимент в урина са определени на комбинирана система H-800/FUS-100, работеща на принципа на рефрактометрия с 11 параметрови тест ленти за суха химия и поточна цитометрия.
 - 2.14. eGFR при възрастни е калкулиран с формулата СКД-ЕРІ. $eGFR = 141 \min(Scr/k, 1)^\alpha \times \max(Scr/k, 1) - 1.209 \times 0.993^{Age} \times 1.018$ (ако е жена), в която Scr - серумен креатинин в $\mu mol/L$, k – 61.9 за жени и 79.6 за мъже, α - -0.329 за жени и -0.411 за мъже, min –минимума на Scr/k или 1, max –максимума на Scr/k или 1..

2.15. eGFR при деца е изчислен с формулите Bedside Schwartz и СКD-EPI40.

$$eGFR_{(\text{Bedside Schwartz})} = (36.2 \times \text{височина в см.}) / \text{серумен креатинин в } \mu\text{mol/L}$$

eGFR_(СКD-EPI40) е базирана на уравнението СКD-EPI, но с коригиран спрямо възрастта серумен креатинин към възрастта 40 години, корекцията на серумния креатинин е извършена по следните формули:

$$\text{при момчета: } \text{Ln}(\text{креатинин}) = \text{Ln}(\text{креатинин}) + 0.259 \times (40\text{-възраст}) - 0.543 \times \text{Ln}(40/\text{възраст}) - 0.00763 \times (40^2\text{-възраст}^2) + 0.0000790 \times (40^3\text{-възраст}^3)$$

$$\text{при момичета: } \text{Ln}(\text{креатинин}) = \text{Ln}(\text{креатинин}) + 0.177 \times (40\text{-възраст}) - 0.223 \times \text{Ln}(40/\text{възраст}) - 0.00596 \times (40^2\text{-възраст}^2) + 0.0000686 \times (40^3\text{-възраст}^3)$$

3. Статистически методи. Използван е статистическия пакет SPSS 27. Приложени са следните методи:

3.1. Тест на Shapiro–Wilk’s за оценка нормалността на разпределението.

3.2. Непрекъснатите променливи, които следват нормално разпределение, са представени чрез средна стойност и стандартно отклонение. Променливите, които не следват нормално разпределение, са представени чрез медиана и интерквартилен обхват (IQR).

3.3. Средните стойности са сравнение чрез t-test на Student–Fisher за установяване на статистически значими разлики при категорични променливи.

3.4. Непараметричните тестове на Mann–Whitney и Kruskal–Wallis са използвани при сравнение на съответно две и повече групи независими променливи, които не следват нормално разпределение.

3.5. За определяне силата и посока на зависимост е приложен корелационен анализ – корелационен коефициент на Pearson при променливи с нормално разпределение и рангов корелационен коефициент Spearman Rho при променливи, които не следват нормалното разпределение.

3.6. За определяне степента на зависимост и за прогнозиране стойностите на зависима променлива е използван линеен регресионен анализ при интервална зависима променлива и логистична регресия и дискриминантен анализ при категорична зависима променлива.

3.7. Receiver-Operating Characteristic (ROC) криви и Area Under the Curve (AUC) са използвани за оценка на чувствителността и специфичността на лабораторните показатели.

3.8. Използвано е критично ниво на значимост $\alpha = 0.05$ или $p < 0.05$.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL

Откриваемият минимум (LLOD) на NGAL е определен като е взето под внимание стандартното отклонение (SD) на 10 паралелно измерени празни проби. LLOD е изчислен по формулата: $LLOD = 3.3 * SD$ -празната проба, и е равен на 6.00 ng/mL. Долната границата на количествено определяне (LLOQ) се дефинира като сигнал, надвишаващ от пет до десет пъти фоновият шум и е в диапазон от 12.00 ng/mL до 18.00 ng/mL.

За проверка на калибрационната крива са оценени получените стойности за LLOQ (12 – 18 ng/mL) и подадената от производителя стойност за горна граница на количествено определяне (ULOQ – 3000 ng/mL). Извършени са 5 паралелни измервания на три проби с прицелни стойности 12 ng/mL, 17.3 ng/mL и 3000 ng/mL. Резултатите за LLOQ при двете използвани проби са: $\bar{x} = 10.46$ ng/mL, $CV = 17.52\%$ ($x_0 = 12$ ng/mL) и $\bar{x} = 16.42$ ng/mL, $CV = 10.12\%$ ($x_0 = 17.3$ ng/mL). Резултатите за ULOQ са: $\bar{x} = 2926.48$ ng/mL и $CV = 1.55\%$ ($x_0 = 3000$ ng/mL). Получените резултати са в съответствие с международните изисквания (CV до 20% за LLOQ и до 15% за ULOQ) и в настоящото проучване е приложена линейност на теста от 12 ng/mL до 3000 ng/mL.

За оценка на невъзпроизводимост в серия са извършени 10 паралелни измервания в серия на 4 подбрани проби. За анализ са използвани 1 проба урина и 3 проби плазма, съответно в референтна, клинично значима и висока област. Пробите са анализирани при спазване на идентични условия (дата, лот № на реактива, оператор). Изчислени са средна стойност (\bar{x}), стандартно отклонение (SD) и коефициент на вариация (CV%). Резултатите са представени в таблица 1 (Табл. 1).

Таблица 1. Данни от статистическата обработка на възпроизводимост в серия

Проба/конц. област	Брой измервания	\bar{x}	SD	CV%
урина/ниска	10	41.11	2.65	6.43
плазма/ниска	10	31.37	1.65	5.26
плазма/кл. значима	10	94.26	1.74	1.85
плазма/висока	10	1221.75	22.27	1.82

За оценка на невъзпроизводимост във време са използвани контролните материали на производителя Bioporto в две концентрационни области. Контролните материали са анализирани в 21 работни дни, при идентични условия преди пациентските серии. Изчислени са средна стойност (\bar{x}), стандартно отклонение (SD) и коефициент на вариация (CV%). Резултатите са представени в таблица 2 (Табл. 2).

Таблица 2. Данни от статистическата обработка на възпроизводимост във време

Проба/конц. област	Брой измервания	\bar{x}	SD	CV%
ниска контрола	21	202.69	9.04	4.5
висока контрола	21	507.03	13.46	2.7

За оценка на недостоверност и неточност са използвани контролни материали на производителя Biorpoto в две диагностично значими области, анализирани в 21 работни дни. Изчислено е процентно отклонение (d%) на средната стойност (\bar{x}) от обявената стойност на производителя (x_0) (Табл. 3). Вътрешният лабораторен качествен контрол е проведен в съответствие с критериите на Westgard с две нива контролен материал.

Таблица 3. Оценка на недостоверност с контролен материал NGAL Test™ Control

Контролен материал	Брой измервания	x_0	\bar{x}	d%
ниска контрола	21	202	202.69	0.34
висока контрола	21	505	507.03	0.40

За оценка на пропорционалната системна грешка е използван методът на аналитичната откриваемост, като е изчислен % recovery. Пригответени са 4 проби, чрез смесване на пациентски проби и концентрирани разтвори. Тестът е извършен и с двата вида биологичен материал – плазма и урина (Табл. 4).

Таблица 4. Оценка на аналитичната откриваемост

Вид проба ng/mL	Добавка ng/mL	Съотношение проба:добавка	Добавена концентрация	Намерена концентрация	Аналитичен добив %
плазма - 31	1222	0.95:0.05	59.5	56.2	95
плазма - 31	1222	0.90:0.10	119	120.5	101
урина - 41	520	0.90:0.10	48	47.1	98

За оценка на преноса на биологичен материал от проби с високи към проби с ниски стойности на изпитвания показател е определен % Carryover. Използван е следния подход: проба А с висока концентрация е анализирана 3 пъти последователно (A1, A2, A3), последвана от проба с ниски стойности, също изследвана 3 пъти последователно (B1, B2, B3). % Carryover е оценен по формулата $\% \text{ Carryover} = \frac{B1-B3}{A3-B3} \times 100$ (Табл. 5).

Таблица 5. Оценка на % Carryover

	1	2	3
Проба А	1208	1166	1236
Проба В	28.5	32.3	32.1
% Carryover	-0.29 %		

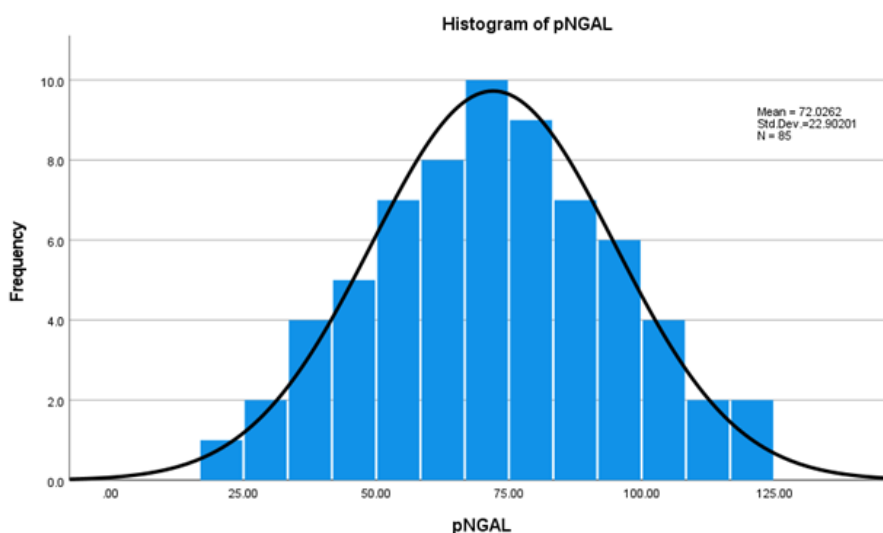
2. Референтни граници на NGAL при възрастни лица. Биологична вариация

В референтна група са включени 90 възрастни доброволци, при 5-ма е установена сигнификантна левкоцитурия и са изключени от последващата обработка на данните. Кохортата, отговаряща на включващите критерии в настоящото проучване, обхваща 85 лица на възраст между 34 – 75г. (52.9 ± 8.3), от които 44 жени и 41 мъже. Характеристика на контролната група от възрастни лица е представена в Таблица 6 (Табл. 6).

Таблица 6. Характеристика на контролната група от възрастни лица

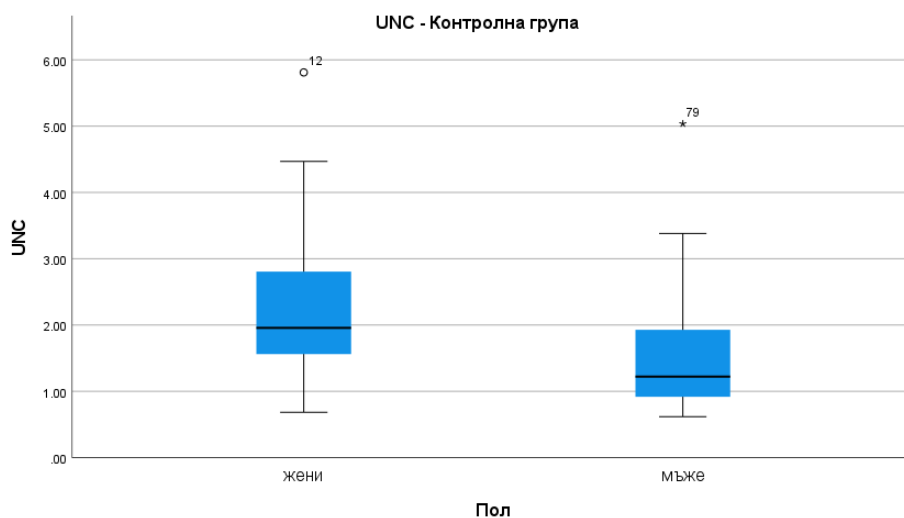
Показател	Мерни единици	Mean \pm SD / Median (IQR)
брой (жени:мъже %)	N (%)	85 (52%:48%)
години	години	52.96 ± 8.39
глюкоза	mmol/L	5.25 ± 0.65
урей	mmol/L	4.96 ± 1.21
креатинин	$\mu\text{mol/L}$	73.5 ± 16.66
eGFR	ml/min/1.73 m ²	91.10 ± 14.78
общ холестерол	mmol/L	5.37 ± 1.00
триглицериди	mmol/L	1.46 ± 1.24
pNGAL	ng/mL	72.03 ± 24.02 / 72.65 (33.38)
uNGAL	ng/mL	21.19 ± 15.74 / 14.50 (11.55)
UNC	$\mu\text{g}/\text{mmol}$	2.08 ± 1.55 / 1.75 (1.25)

Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите за показателите pNGAL, uNGAL и UNC, както и визуалната оценка на хистограмите и P-P Plots, показва липсата на Гаусово разпределение. Тестът на Shapiro–Wilk's ($p < 0.05$) демонстрира коефициенти за асиметрия и ексцес със $z\text{-value} > 1.96$, което отхвърля нулевата хипотеза за нормално разпределение и за трите показателя. Последващата обработка е извършена след трансформация на данните и непараметрични методи за анализ. След статистическа обработка на резултатите и нормализиране на разпределението, е приложен персентилен метод за изчисление на референтните граници (Фиг. 1). Изведените референтни стойности съответстват на 2.5 и 97.5 персентил, при 95% доверителен интервал. Референтните граници в цялата обследвана референтна група са: за pNGAL – 25 – 119.49 ng/mL, за uNGAL < 52.37 ng/mL, UNC < 5.16 $\mu\text{g}/\text{mmol}$.



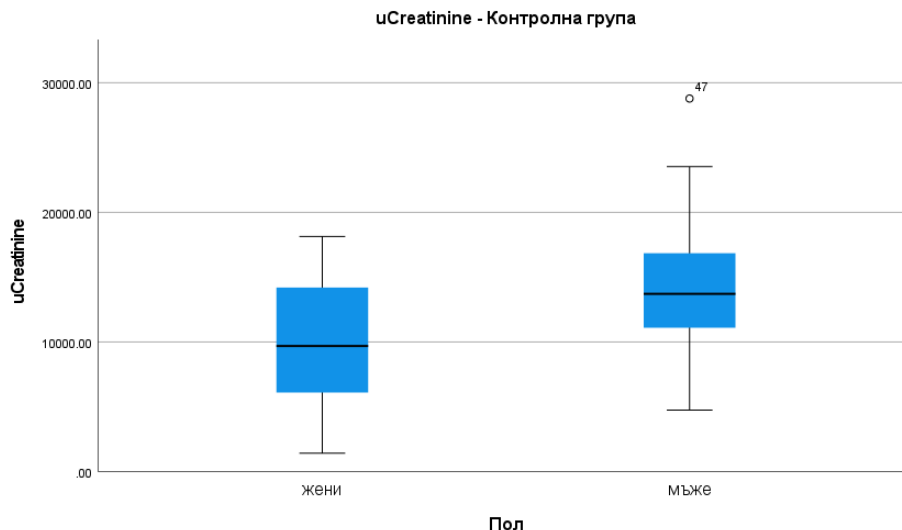
Фиг. 1. Хистограма, представяща нормалното разпределение на трансформираните резултатите за pNGAL в референтната група > 18 год.

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL, uNGAL и UNC в цялата референтна група са както следва: 72.65 (52.38 – 85.75) ng/mL, 14.50 (12.00 – 23.55) ng/mL и 1.75 (1.25 – 2.33) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Медианата на pNGAL при жените е 73.20 (51.30 – 85.30) ng/mL и при мъжете е 72.50 (52.25 – 89.20) ng/mL. Медианата на uNGAL при жените е 19.50 (12.30 – 24.10) ng/mL и при мъжете е 12.55 (12.00 – 23.20) ng/mL. Медианата на UNC при жените е 1.96 (1.56 – 2.81) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при мъжете е 1.22 (0.90 – 1.97) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (Фиг.2). Резултатите от теста на Mann-Whitney показват статистически значимо по-високи резултати на UNC при жени в сравнение с мъже $U = 207.0$, $p = 0.003$, $r = -0.402$. Диференцираните по пол референтни граници за UNC са: при жени < 6.34 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при мъже < 3.36 $\mu\text{g}/\text{mmol}$.



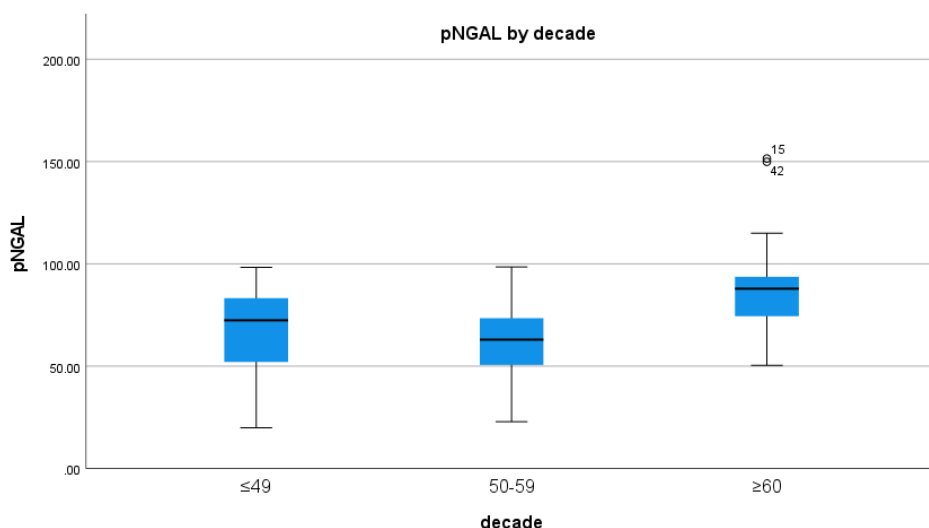
Фиг. 2. Разпределение на резултатите за UNC при жени и мъже в референтната група възрастни лица

Медианата на uCreatinine при жените е 9695 (6073 – 14241) $\mu\text{mol/L}$ и при мъжете е 13718 (10644 – 17132) $\mu\text{mol/L}$ (Фиг. 3). Резултатите от теста на Mann–Whitney показват статистически значимо по-високи резултати на uCreatinine при мъже в сравнение с жени $U = 252.0$, $p = 0.023$, $r = -0.303$.



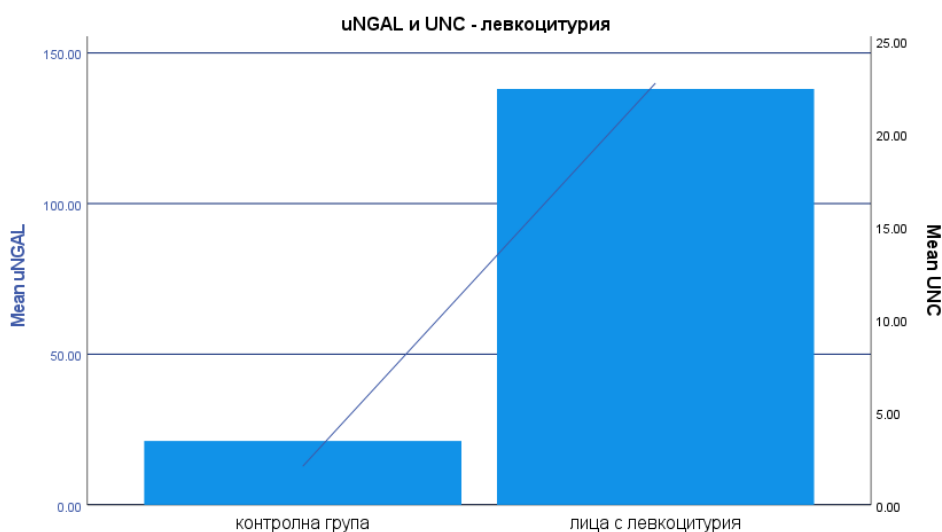
Фиг. 3. Разпределение на резултатите за uCreatinine при жени и мъже в референтната група възрастни лица

Лицата са разделени в три възрастови периода: ≤ 49 г. ($N = 30$), 50-59 г. ($N = 36$) и ≥ 60 г. ($N = 19$). В зависимост от възрастта, медианата и интерквартилният обхват на pNGAL, uNGAL и UNC са както следва: при лица ≤ 49 - pNGAL е 72.4 (49.47-83.42) ng/mL, uNGAL е 18.15 (12.00-24.70) ng/mL и UNC е 1.45 (1.00-2.16) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, във възрастовата декада 50-59 - pNGAL е 63.00 (50.60-74.10) ng/mL, uNGAL е 13.15 (12.00-17.42) ng/mL и UNC е 1.77 (0.93-2.60) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при лица ≥ 60 - pNGAL е 87.90 (74.20-97.30) ng/mL, uNGAL е 23.75 (12.00-33.17) ng/mL и UNC е 1.91 (1.74-2.48) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (Фиг. 4). Медианата на pNGAL при всички лица под 60 г. е 67.70 (50.60-81.60) ng/mL и при лица над 60 г. е 87.90 (74.20-97.30) ng/mL. Резултатите от теста на Mann–Whitney показват сигнификантно по-високи резултати на pNGAL при лицата над 60 години спрямо тези под 60 годишна възраст - $U=200.0$, $p<0.001$, $r=-0.40$. С цел да се изследва асоциацията между стойностите на pNGAL с възрастта и eGFR е използван коефициентът на ранговата корелация Spearman Rho. Корелационният анализ показва статистически значима отрицателна корелация между възрастта и eGFR ($\rho=-0.473$, $p<0.001$), между pNGAL и eGFR ($\rho=-0.354$, $p=0.003$), както и положителна корелация между pNGAL и възрастта ($\rho=0.255$, $p=0.035$). Диференцирането на контролната кохорта в три групи доведе до намаляване на броя лица във всяка група и ограничи възможността за извеждането на възрастово зависими референтни граници за pNGAL.



Фиг. 4. Разпределение на резултатите за pNGAL по възрастови периоди в референтната група възрастни лица

При 5-ма от лицата в проучването е установена сигнификантна левкоцитурия и са изключени от обработката на данните. Средната стойност на uNGAL измерена при тях е $\bar{x}=141.7$ ng/mL и $UNC - \bar{x}=23.32$ μ g/mmol. Получените резултати за uNGAL и UNC са значимо по-високи от определените референтни граници (Фиг. 5).



Фиг. 5. Mean - uNGAL и UNC при лица без и с левкоцитурия

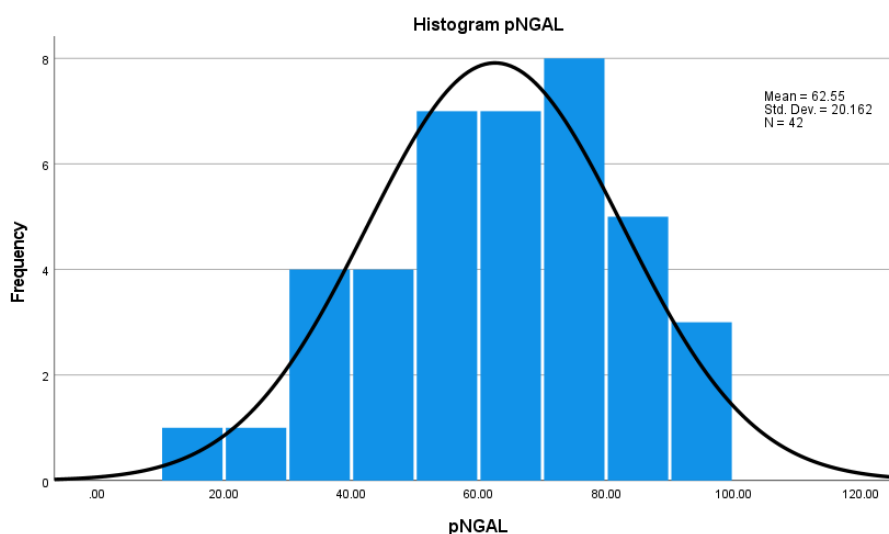
3. Референтни граници на NGAL при деца. Биологична вариация

В референтна група са включени 45 деца, при 3 от тях е установена съответно левкоцитоза, сигнификантна левкоцитурия и протеинурия и са изключени от последващата обработка на данните. Кохортата, отговаряща на включващите критерии в настоящото проучване, обхваща 42 лица на възраст от 5 до 17 г. (12.50 ± 3.69), от които 21 момичета и 21 момчета (Табл. 7).

Таблица 7. Характеристика на контролната група - деца

Показател	Мерни единици	Mean \pm SD/median(IQR)
брой (момичета:момчета)	N (%)	42 (50%:50%)
години	години	12.50 \pm 3.69
урея	mmol/L	3.94 \pm 1.05
креатинин	μ mol/L	59.66 \pm 16.22
eGFR	ml/min/1.73 m ²	94.11 \pm 16.42
глюкоза	mmol/L	4.69 \pm 0.71
общ холестерол	mmol/L	4.28 \pm 0.96
триглицериди	mmol/L	0.95 \pm 0.46
pNGAL	ng/mL	62.55 \pm 20.16/ 66.15 (28.45)
uNGAL	ng/mL	19.96 \pm 13.93/ 13.70 (10.35)
UNC	μ g/mmol	1.72 \pm 0.90/ 1.47 (1.06)

Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите за показателите pNGAL, uNGAL и UNC, както и визуалната оценка на хистограмите и P-P Plots показва нормално разпределение на резултатите за pNGAL и липсата на Гаусово разпределение на резултатите за uNGAL и UNC (Фиг. 6). Тестът на Shapiro–Wilk’s ($p < 0.05$) демонстрира коефициенти за асиметрия и ексцес със z-value > 1.96 , което отхвърля нулевата хипотеза за нормално разпределение на резултатите за uNGAL и UNC. Последващата обработка на резултатите за uNGAL и UNC е извършена след двустъпален подход за трансформация и нормализиране на разпределението на данните. Изведените референтни стойности, които съответстват на 2.5 и 97.5 перцентил, при 95% доверителен интервал в контролната група под 18 г., са: pNGAL < 96.88 ng/mL, uNGAL < 47.30 ng/mL, UNC < 3.48 μ g/mmol.



Фиг. 6. Хистограма, представяща нормалното разпределение на резултатите за pNGAL в референтната група – под 18 г.

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL, uNGAL и UNC в цялата кохорта са както следва: 66.15 (48.78 – 77.23) ng/mL, 13.70 (12.00 – 22.35) ng/mL и 1.47 (1.15 – 2.21) µg/mmol. T-test на Student–Fisher не установи сигнификантна разлика между резултатите за pNGAL при диференциране по пол ($t = -1.49$, $p = 0.146$). Теста на Mann–Whitney не показва статистически значима разлика в стойностите на uNGAL и UNC между подгрупите – момичета и момчета ($U=148.5$, $p = 0.094$ и $U = 198.0$, $p = 0.754$). Не се установи сигнификантна корелация и на трите маркера с възрастта (pNGAL – $r = 0.140$, $p = 0.390$, uNGAL – $\rho = 0.129$, $p = 0.422$ и UNC – $\rho = -0.162$, $p = 0.313$).

4. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ при ЗД II

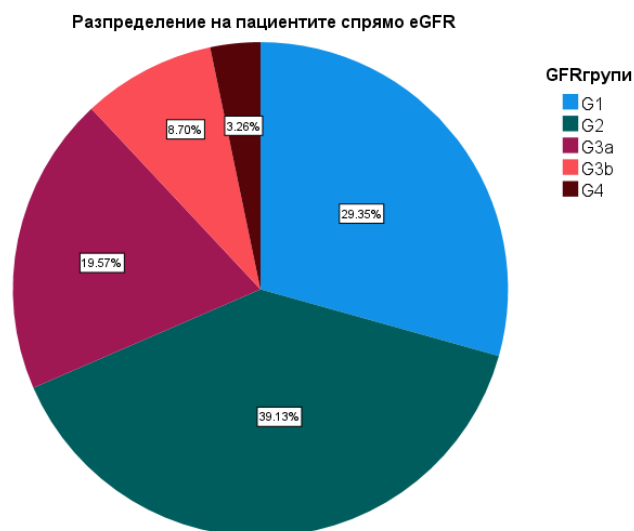
За участие в проучването са насочени 99 лица със ЗД II, но при 7 пациенти са констатирани критерии за изключване от групата. Лицата със ЗД II отговарящи на включващите критерии са 92-ма пациенти на възраст от 18 до 89 г. (58.28 ± 14.69 г.). Разпределението по пол в групата е: 55% (N = 51) жени на средна възраст 59.73 ± 16.98 г. и 45% (N = 41) мъже на средна възраст 56.49 ± 11.17 г. (Табл. 8).

Таблица 8. Характеристика на пациентската група със ЗД II

Показател	Пациенти ЗД II mean \pm SD/ median (IQR)	Контролна група >18г. mean \pm SD/ median (IQR)	P
брой	92	85	
пол жени:мъже (%)	55%:45%	52%:48%	= 0.884
години	58.28 ± 14.69 г.	52.96 ± 8.39	< 0.004
глюкоза (mmol/L)	11.98 ± 6.49	5.25 ± 0.65	< 0.001
урея (mmol/L)	7.77 ± 4.08	4.96 ± 1.21	< 0.001
креатинин (µmol/L)	94.82 ± 41.01	73.5 ± 16.66	< 0.001
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	73.04 ± 24.68	91.10 ± 14.78	< 0.001
общ холестерол (mmol/L)	5.22 ± 1.79	5.37 ± 1.00	= 0.508
триглицериди (mmol/L)	3.05 ± 2.79	1.46 ± 1.24	< 0.001
HDL-холестерол (mmol/L)	1.07 ± 0.31	*	*
LDL-холестерол (mmol/L)	2.79 ± 1.17	*	*
AER (mg/l)	201 ± 525	*	*
HbA1c (%)	9.32 ± 2.39	*	*
ACR (g/mol)	29.06 ± 62.96	*	*
pNGAL (ng/mL)	$97.58 \pm 63.42/79.10$ (64.98)	$72.03 \pm 24.02/72.65$ (33.38)	$p = 0.044$
uNGAL (ng/mL)	$59.07 \pm 72.04/32.30$ (67.15)	$21.19 \pm 15.74/14.50$ (11.55)	$p < 0.001$
UNC (µg/mmol)	$10.62 \pm 15.14/4.78$ (9.05)	$2.08 \pm 1.55/1.75$ (1.25)	$p < 0.001$

Включените лица със ЗД II са разпределени в подгрупи спрямо – ACR, eGFR и наличието на ДБЗ. Спрямо нивото на ACR са формирани три групи: A1 при ACR < 3 g/mol, A2 при ACR

– 3 – 30 g/mol и А3 при ACR > 30 g/mol. Спрямо eGFR са формирани две групи: ≤G2 при eGFR ≥ 60 ml/min/1.73 m² и ≥ G3 при eGFR < 60 ml/min/1.73 m². Пациентите са разделени само в две категории в зависимост от eGFR, тъй като при разпределението им от G1 до G4 (G5 е изключващ критерий за проучването) се намалява броят лица в отделните подгрупи, което ограничава възможността за статистическа обработка на данните (Фиг. 7).



Фигура 7. Разпределение на пациентите спрямо eGFR – категория G1 до G4

Съгласно насоките на KDIGO 2020, възприетите в настоящото проучване критерии за диагностициране на ДБЗ, са ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 ml/min/1.73 m². Спрямо така дефинираните критерии са формирани две групи – ЗД II без ДБЗ и ЗД II със ДБЗ (Табл. 9).

Таблица 9. Характеристика на групите пациенти със ЗД II

Категория	Критерий	Mean ± SD	N (жени:мъже)	Години
A1	ACR < 3 g/mol	ACR - 1.14 ± 0.54	42 (21:21)	59.12 ± 13.31
A2	ACR - 3 – 30 g/mol	ACR - 9.88 ± 7.45	28 (20:8)	55.00 ± 17.59
A3	ACR > 30 g/mol	ACR - 110.48 ± 93.00	21 (10:11)	60.42 ± 13.17
≤G2	eGFR ≥ 60 ml/min/1.73 m ²	eGFR - 87.25 ± 16.71	63 (36:27)	54.57 ± 13.14
≥G3	eGFR < 60 ml/min/1.73 m ²	eGFR - 46.41 ± 11.53	29 (15:14)	65.25 ± 15.10
ЗД без ДБЗ	ACR < 3 g/mol и eGFR ≥ 60 ml/min/1.73 m ²	ACR - 1.13 ± 0.50 eGFR - 89.03 ± 15.50	36 (16:20)	56.58 ± 11.95
ЗД с ДБЗ	ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 ml/min/1.73 m ²	ACR - 47.34 ± 75.80 eGFR - 62.77 ± 24.10	56 (35:21)	59.38 ± 16.22

Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите за pNGAL, uNGAL и UNC в цялата кохорта пациенти със ЗД II и в отделните подгрупи показва липсата на Гаусово разпределение. Тестът на Shapiro–Wilk’s (p < 0.05) демонстрира коефициенти за асиметрия и

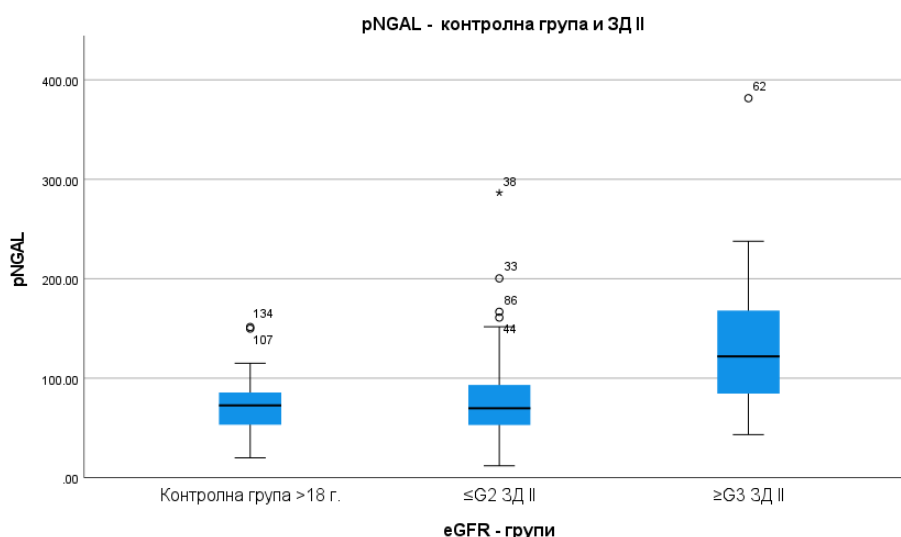
ексцес със z-value >1.96, което отхвърля нулевата хипотеза за нормално разпределение и за трите показателя във всяка една от обследваните подгрупи. Последващата статистическа обработка на данните е извършена с непараметрични методи за анализ.

4.1. pNGAL като маркер за диагноза на ДБЗ при пациенти със ЗД II

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в цялата пациентска кохорта е 79.10 (57.30 – 122.28) ng/mL. Резултатите от теста на Mann–Whitney показват статистически значимо по-високи резултати на pNGAL при пациенти със ЗД II в сравнение с контролната група (79.10 vs 72.03 ng/mL) $U = 1964.0$, $p = 0.044$, $r = -0.171$.

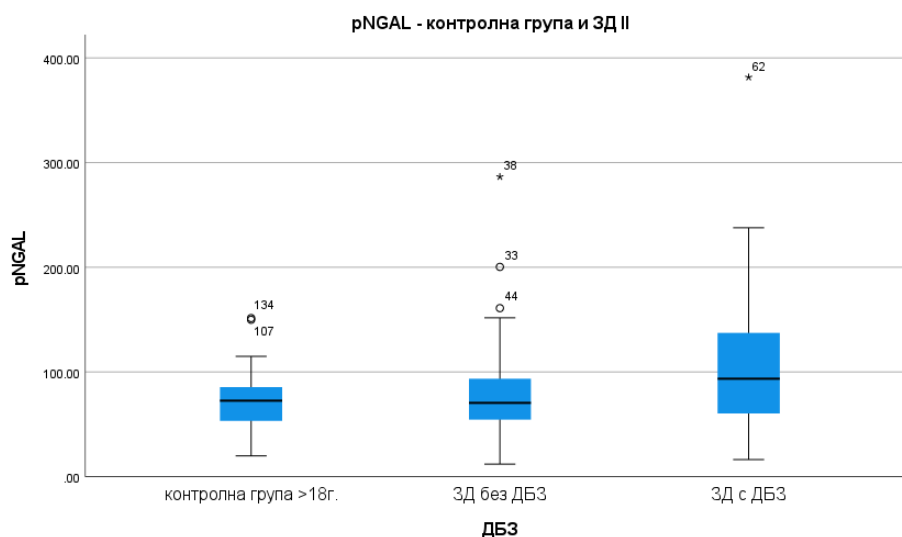
Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в трите подгрупи, разделени в зависимост от ACR, са: A1 – 71.10 (52.30 – 105.30) ng/mL, A2 – 82.10 (51.60 – 102.47) ng/mL и A3 – 121.70 (66.65 – 171.20) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis не установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между отделните подгрупи пациенти ($\chi^2(2) = 4.250$, $p = 0.119$). Спрямо контролната група сигнификантно по-високи резултати за pNGAL имат само пациентите в A3 (121.70 vs 72.03 ng/mL) $U = 332.0$, $p = 0.007$, $r = -0.293$.

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо eGFR, са: $\leq G2$ – 69.8 (52.60 – 93.60) ng/mL и $\geq G3$ – 121.90 (77.70 – 174.30) ng/mL. Тестът на Mann–Whitney установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между отделните подгрупи пациенти $U = 278.0$, $p < 0.001$, $r = -0.406$. Спрямо контролната група сигнификантно по-високи стойности за pNGAL имат само пациентите в подгрупа $\geq G3$ (121.90 vs 72.03 ng/mL), $U=319.0$, $p < 0.001$, $r = -0.443$ (Фиг. 8).



Фигура 8. Разпределение на резултатите за pNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД II, разделени спрямо eGFR

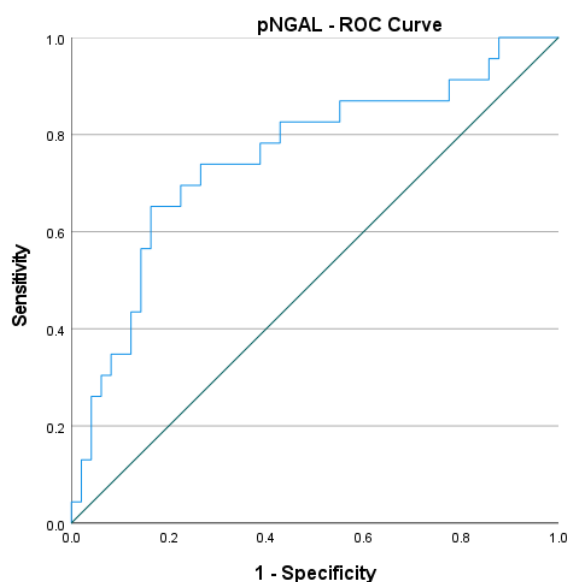
Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL при пациентите със ЗД II без ДБЗ е 70.45 (53.42 – 93.80) ng/mL и при пациентите с ДБЗ е 93.55 (60.27 – 138.65) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че концентрацията на pNGAL в отделните пациентски подгрупи и контролната група се различават статистически значимо помежду си ($\chi^2(2) = 7.675$, $p=0.022$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна само между пациентите с ДБЗ и контролната група (93.55 vs 72.03 ng/mL) $U = 918.50$, $p = 0.005$, $r = -0.270$ (Фиг. 9).



Фигура 9. Разпределение на резултатите за pNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД II без ДБЗ и с ДБЗ

ROC анализът демонстрира, че pNGAL има добра диагностична ефективност в отдиференциране на пациенти със ЗД II с понижен eGFR ($eGFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$) от тези със запазен eGFR ($eGFR \geq 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$), с AUC-ROC – 0.753. При cut-off – 121.65 ng/mL, стойност над определената горна граница на референтния интервал, тестът има диагностична чувствителност и специфичност – 57% и 84%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – LR+ 3.64 и LR- 0.50 и положителната и отрицателната предсказваща стойност - 71% и 86% в разграничаване на пациентите със ЗД II с понижен eGFR. Диагностичната ефективност, с която стойност на pNGAL >121.65 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД II с $eGFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ е 82% (Фиг. 10).

pNGAL демонстрира лоша диагностична ефективност в разграничаване на пациентите със ЗД II с албуминурия от тези с нормоалбуминурия (AUC-ROC-0.580). Самостоятелното приложение на pNGAL има достатъчна към лоша диагностична ефективност за откриване на пациенти с ДБЗ сред пациентите със ЗД II с AUC-ROC – 0.619, с оглед на тази незадоволителна надеждност на маркерът не са изведени cut-off стойности.

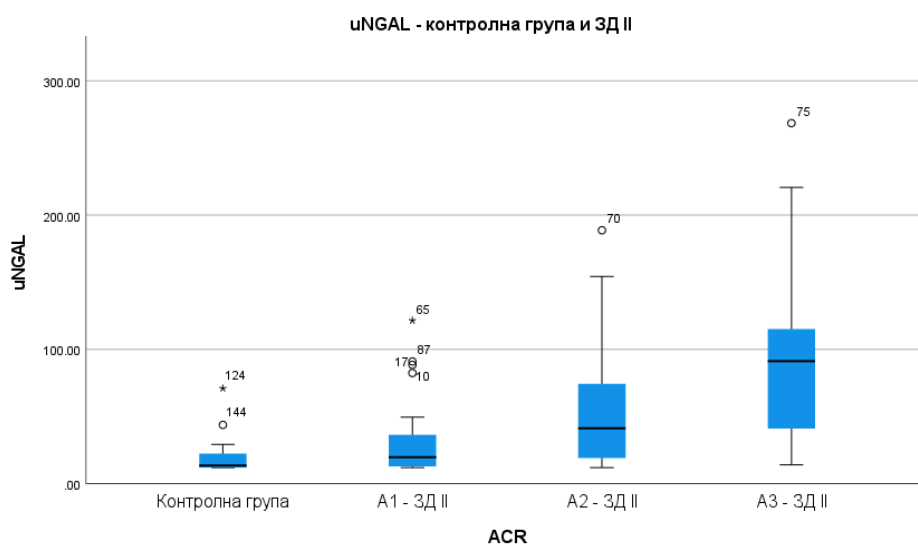


Фигура 10. ROC крива на pNGAL в разграничаване на лицата със ЗД II с понижен eGFR (eGFR <60 ml/min/1.73 m²)

4.2. uNGAL и UNC като маркери за диагноза на ДБЗ при пациенти със ЗД II

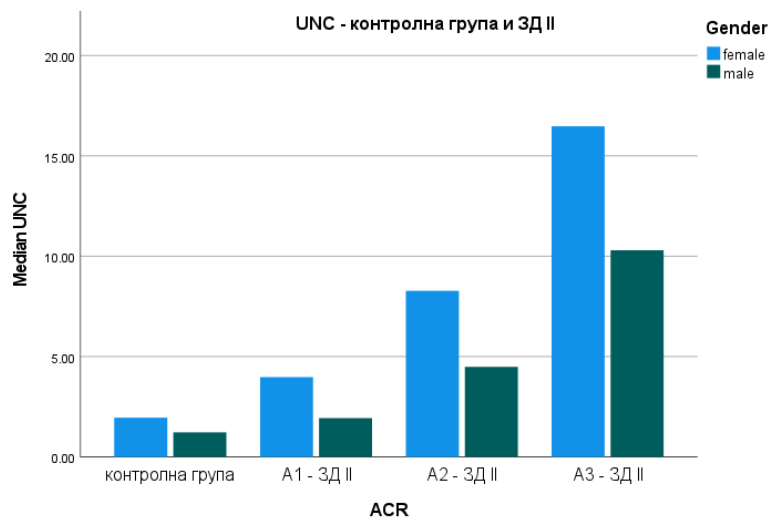
Медианата и интерквartilният обхват на uNGAL и UNC в цялата пациентска кохорта са 32.30 (17.75 – 84.90) ng/mL и 4.78 (2.26 – 11.31) µg/mmol. Резултатите от теста на Mann–Whitney показват, че пациентите със ЗД II имат статистически значимо по-високи резултати за uNGAL и UNC спрямо контролната група (32.30 vs 14.50 ng/mL) $U = 1178.5$, $p < 0.001$, $r = -0.428$ и (4.78 vs 1.75 µg/mmol) $U = 759.0$, $p < 0.001$, $r = -0.575$.

Медианата и интерквartilният обхват на uNGAL в трите подгрупи пациенти, разделени спрямо ACR, са: A1 – 19.75 (12.45 – 37.25) ng/mL, A2 – 41.25 (19.02 – 80.87) ng/mL и A3 – 91.30 (35.80 – 136.50) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че концентрацията на uNGAL в отделните пациентски подгрупи и контролната група се различават статистически значимо помежду си ($\chi^2(3) = 47.17$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна за всички сравнения между групите, с изключение между A2 и A3 ($U = 151.00$, $p = 0.022$) и между A1 и контролната група ($U = 846.00$, $p = 0.039$). Пациентите в подгрупа A1 имат статистически значимо по-високи резултати от тези в A2 и в A3 (19.75 vs 41.25 ng/mL), $U = 287.00$, $p = 0.007$, $r = -0.335$ и (19.75 vs 91.30 ng/mL), $U = 116.00$, $p < 0.001$, $r = -0.592$. Спрямо контролната група сигнификантно по-високи резултати имат подгрупи A2 и A3 (41.25 vs 14.50 ng/mL), $U=257.00$, $p < 0.001$, $r = -0.49$ и (91.30 vs 14.50 ng/mL), $U = 75.00$, $p < 0.001$, $r = -0.675$ (корекцията на Bonferroni за α при сравнение на 4 групи – статистическата значимост $p \leq 0.008$) (Фиг. 11).



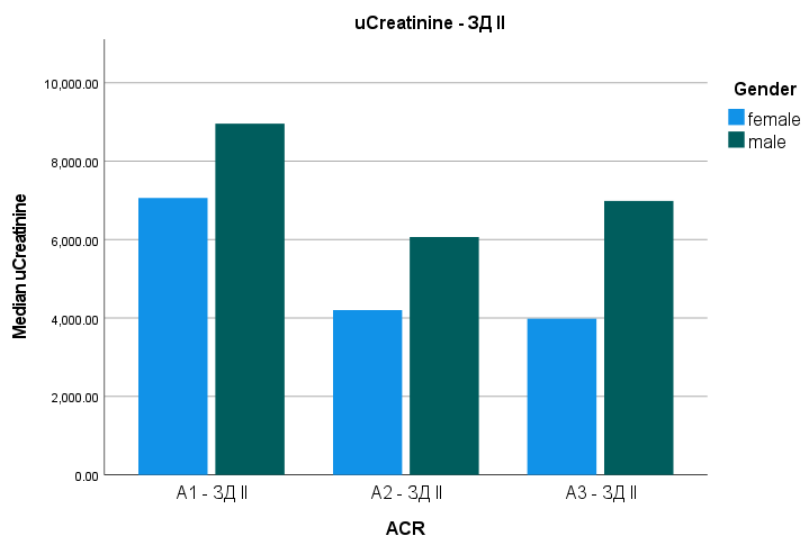
Фигура 11. Разпределение на резултатите за uNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД II, разделени спрямо ACR

Съотношението UNC има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти: A1 – 2.52 (1.83 – 4.32) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, A2 – 7.86 (4.11 – 16.46) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и A3 – 10.94 (7.63 – 33.26) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима разлика в резултатите за UNC между отделните подгрупи пациенти и контролната група ($\chi^2(3)=74.59$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна за всички сравнения между групите, с изключение между A2 и A3 ($U = 148.00$, $p = 0.018$). Пациентите в подгрупа A1 имат статистически значимо по-високи резултати от тези в A2 и A3 (2.52 vs 7.86 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 172.00$, $p < 0.001$, $r = -0.534$ и (2.52 vs 10.94 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 51.00$, $p < 0.001$, $r = -0.717$. Резултатите за UNC във всяка една подгрупа от A1 до A3 са статистически значимо по-високи спрямо контролната група, включително и при A1 (2.52 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 635.0$, $p < 0.001$, $r = -0.368$ (корекцията на Bonferroni за α при сравнение на 4 групи – статистическата значимост $p \leq 0.008$). Пациентите със ЗД II бяха допълнително разделени и по пол, медианите на UNC при жени в отделните групи са: A1- 3.98 (2.22 – 5.96) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, A2 – 8.28 (4.4 8– 18.11) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и A3 – 16.48 (9.13 – 33.78) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при мъже A1 – 1.93 (1.73 – 2.76) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, A2 – 4.49 (1.65 – 11.36) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и A3 – 10.30 (4.95 – 32.86) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Във всяка една от подгрупите стойностите на UNC са по-високи при жени в сравнение с мъже, но разликата е сигнификантно значима само в подгрупа A1 ($U = 77.00$, $p < 0.001$, $r = -0.525$) и намалява с прогресията на албуминовата екскреция (A2 – $p = 0.119$, и A3 - $p = 0.426$). Не се установи сигнификантна разлика в стойностите на UNC между полово диференцираните подгрупи A2 и A3 (Фиг. 12).



Фигура 12. Медиана на UNC при жени и мъже в контролната група и при пациентите със ЗД II, разделени спрямо ACR

Медианата на uCreatinine при жените е 4670 (3730 – 9163) $\mu\text{mol/L}$ и при мъжете е 8444 (5604 – 11893) $\mu\text{mol/L}$ (Фиг. 13). Тестът на Mann–Whitney установи, че мъжете имат статистически значимо по-високи резултати от жените $U = 687.00$, $p = 0.012$, $r = -0.264$.

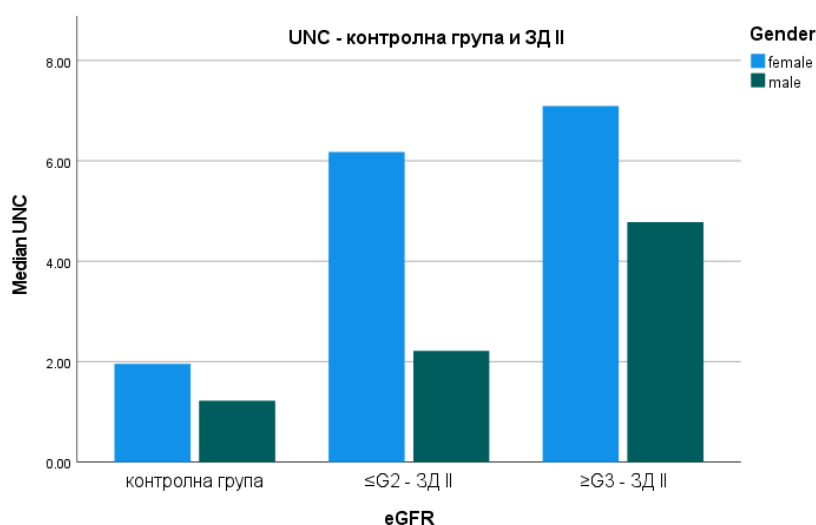


Фигура 13. Медиана на uCreatinine при жени и мъже при пациентите със ЗД II, разделени спрямо ACR

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо eGFR, са: $\leq G2$ – 28.45 (16.80 – 49.72) ng/mL и $\geq G3$ – 44.20 (22.55–109.15) ng/mL . Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между контролната група и пациентските подгрупи ($\chi^2(2) = 35.830$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказа сигнификантна само спрямо контролната група. Резултатите за uNGAL в пациентските групи $\leq G2$ и $\geq G3$ са статистически значимо по-високи

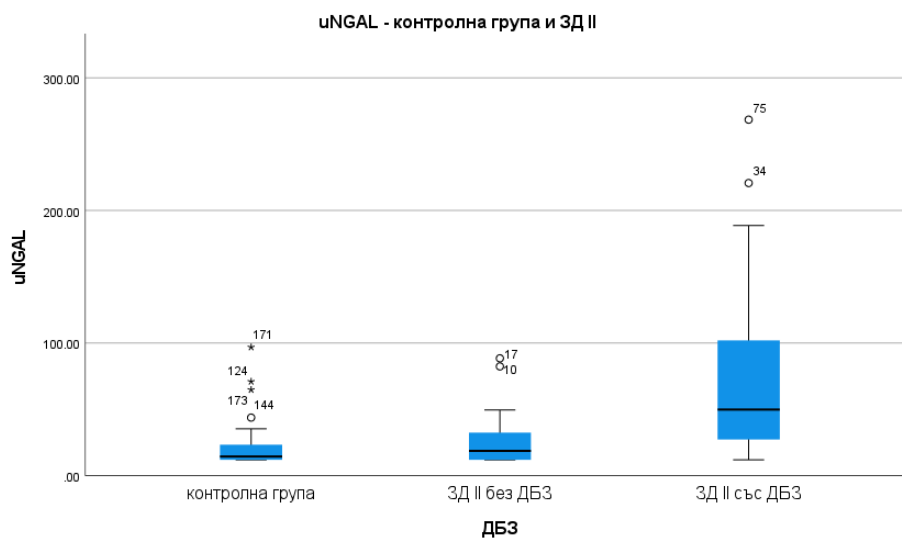
спрямо контролната група (28.45 vs 14.50 ng/mL), $U = 877.0$, $p < 0.001$, $r = -0.383$ и (44.20 vs 14.50 ng/mL), $U = 301.0$, $p < 0.001$, $r = -0.519$).

Съотношението UNC има медиана и интерквартилен обхват в подгрупа $\leq G2$ – 4.39 (2.03 – 12.54) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и в подгрупа $\geq G3$ – 6.21 (3.99 – 10.46) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима разлика в стойностите на UNC между контролната група и пациентските подгрупи ($\chi^2(2) = 44.894$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна само спрямо контролната група. Резултатите за UNC в пациентските групи $\leq G2$ и $\geq G3$ са статистически значимо по-високи спрямо контролната група (4.39 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 573.0$, $p < 0.001$, $r = -0.546$ и (6.21 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U=186.0$, $p < 0.001$, $r = -0.629$. Медианата на UNC при жени в подгрупа $\leq G2$ е 6.17 (3.43 – 13.46) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и в $\geq G3$ е 7.09 (4.35 – 17.35) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при мъже в $\leq G2$ е 2.21 (1.80 – 4.94) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и в $\geq G3$ е 4.78 (1.97 – 10.04) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Не се установи значима разлика в стойностите на UNC между полово диференцираните подгрупи $\leq G2$ и $\geq G3$. Стойности на UNC са по-високи при жени в сравнение с мъже във всяка една от подгрупите, но разликата е сигнификантна само в подгрупа $\leq G2$ ($U = 215.0$, $p = 0.006$, $r = -0.366$) (Фиг. 14).



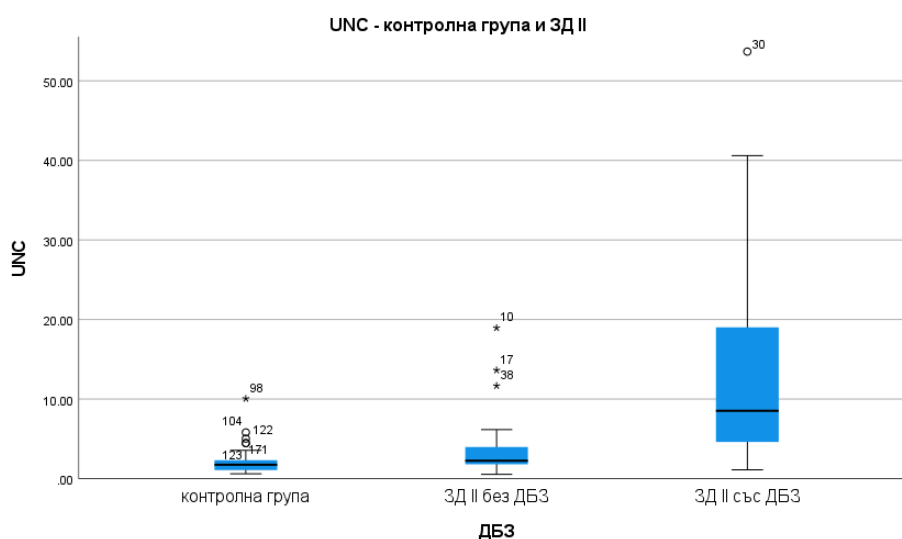
Фигура 14. Медиана на UNC при мъже и жени в контролната група и при пациентите със ЗД II, разделени спрямо eGFR

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL при пациентите със ЗД II с нормална бъбречна функция е 18.70 (12.00 – 33.90) ng/mL и при пациентите с ДБЗ е 49.80 (26.90 – 104.30) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че концентрацията на uNGAL в отделните пациентски групи и контролната група се различават значимо ($\chi^2(2) = 44.25$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест тази разлика се оказва сигнификантна между пациентите с ДБЗ и контролната група (49.80 vs 14.50 ng/mL), $U = 418.00$, $p < 0.001$, $r = -0.611$ и между двете пациентски групи (18.70 vs 49.80 ng/mL), $U = 370.00$, $p < 0.001$, $r = -0.484$ (Фиг. 15).



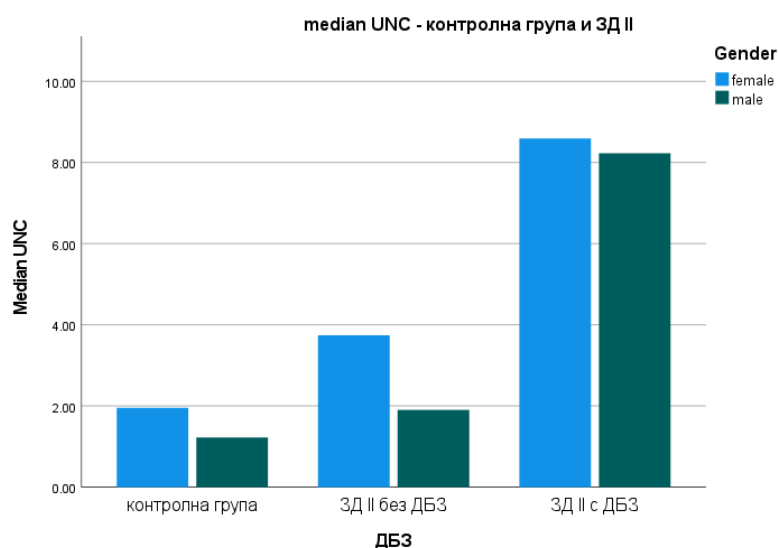
Фигура 15. Разпределение на резултатите за uNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД II без ДБЗ и с ДБЗ

Медианата и интерквартилният обхват на UNC при пациентите със ЗД с нормална бъбречна функция е 2.26 (1.80 – 4.07) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и при пациентите с ДБЗ е 8.54 (4.59 – 19.84) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че стойностите на UNC в отделните пациентски подгрупи и контролната група се различават статистически значимо ($\chi^2(2) = 69.53$ $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест тази разлика се оказва сигнификантна за всички сравнения между групите – контролната група и ЗД II без ДБЗ (2.26 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 578.00$, $p = 0.002$, $r = -0.328$, контролна група и ЗД II с ДБЗ (8.54 vs 1.75 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 181.00$, $p < 0.001$, $r = -0.752$ и между двете пациентски групи (2.26 vs 8.54 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 259.00$, $p < 0.001$, $r = -0.591$ (Фиг. 16).



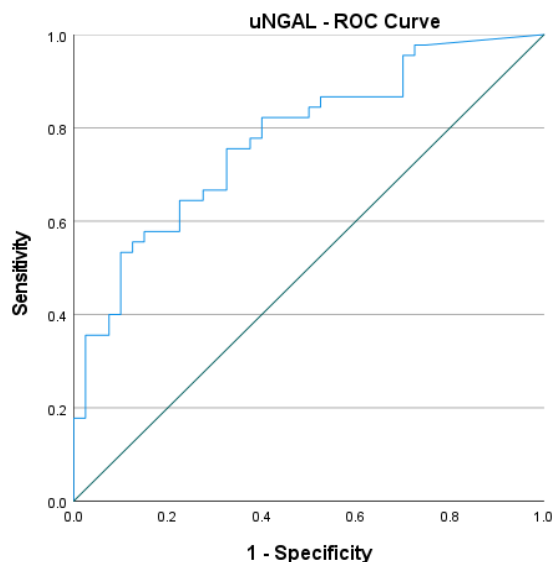
Фигура 16. Разпределение на резултатите за UNC при контролната група и при пациентите със ЗД II без ДБЗ и с ДБЗ

При разделяне по пол, медианите на UNC в отделните подгрупи са както следва: при жени – ЗД II без ДБЗ – 3.74 (2.10 – 6.07) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и ЗД II с ДБЗ – 8.59 (4.55 – 19.22) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, и при мъже – ЗД II без ДБЗ – 1.90 (1.65 – 2.82) $\mu\text{g}/\text{mmol}$ и ЗД II с ДБЗ – 8.22 (4.45 – 20.67) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че концентрацията на UNC в отделните пациентски подгрупи и контролната група се различават статистически значимо помежду си, както при жени ($\chi^2(2) = 39.48$, $p < 0.001$), така и при мъже ($\chi^2(2) = 29.07$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест при жените, тази разлика се запази сигнификантна за всички сравнения между групите. При мъжете разликата в стойностите между контролната група и пациентите без ДБЗ не достигна сигнификантна значимост ($U = 136.00$, $p = 0.019$) (корекцията на α при сравнение на 3 групи – статистическата значимост $p \leq 0.017$). Стойностите на UNC са по-високи при жени в сравнение с мъже и в двете подгрупи, но разликата по пол е сигнификантно значима само при пациентите със ЗД без ДБЗ ($U = 60.00$, $p = 0.003$, $r = -0.497$) (Фиг.17).



Фигура 17. Медиана на UNC при жени и мъже в контролната група и при пациентите със ЗД II без ДБЗ и с ДБЗ

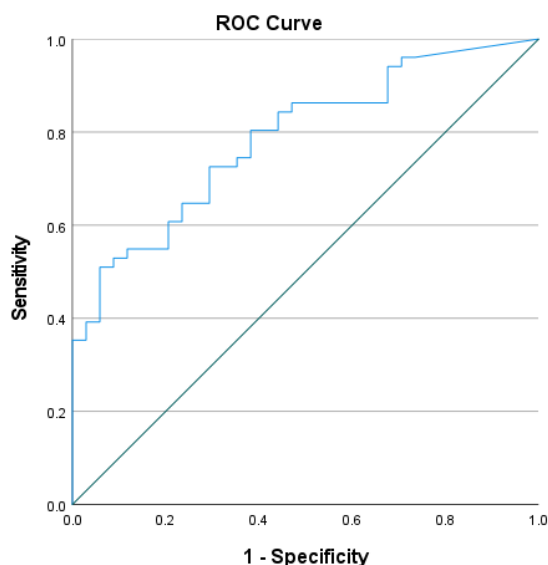
ROC анализът демонстрира добра диагностична ефективност на uNGAL в отдиференциране на пациенти със ЗД II с повишен ACR (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.776. При cut-off – 53.30 ng/mL, стойност над определената горна граница на референтния интервал, маркерът е с диагностична чувствителност и специфичност – 47% и 90%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – LR+ 4.67 и LR- 0.59 и положителната и отрицателната предсказваща стойност 84% и 60% в разграничаване на пациентите със ЗД II с повишен ACR. Диагностичната ефективност, с която стойност на pNGAL > 53.30 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД II с ACR > 3.0 g/mol е 67% (Фиг. 18).



Фигура 18. ROC крива на uNGAL - разграничаване на пациенти със ЗД II с повишен ACR

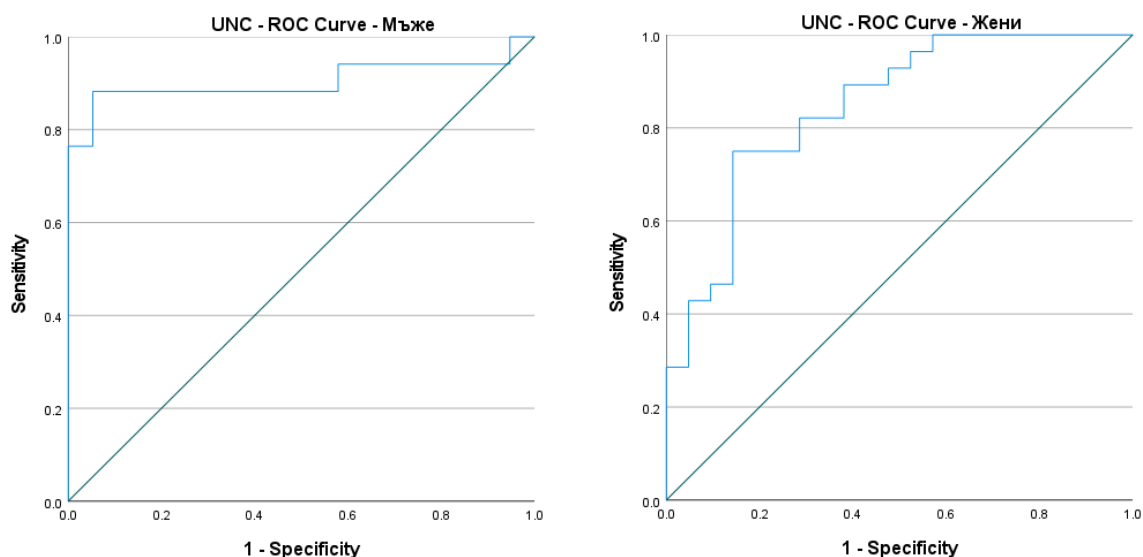
uNGAL има достатъчна диагностична ефективност за откриване на пациенти със ЗД II с намалена гломерулна филтрация ($eGFR < 60\text{ml/min/1.73 m}^2$) с AUC-ROC – 0.646, с оглед на тази незадоволителната надеждност на маркера не са изведени cut-off стойности.

uNGAL има добра диагностична ефективност в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II (ЗД без ДБЗ vs ЗД с ДБЗ) с AUC-ROC – 0.787. При cut-off – 53.30 ng/mL, стойност над определената горна граница на референтния интервал, маркерът е с диагностична чувствителност и специфичност - 45% и 94%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – LR+ 7.64 и LR- 0.58 и положителната и отрицателната предсказваща стойност 92% и 53% в разграничаване на пациентите със ЗД II с ДБЗ. Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 53.30 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД II с ДБЗ е 65% (Фиг. 19).



Фигура 19. ROC крива на uNGAL - разграничаване на пациентите със ЗД II с ДБЗ

Съотношението UNC показва много добра диагностична точност в отдиференцирането на пациентите със ЗД II с албуминурия (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.876. При cut-off – 4.62 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, маркерът има диагностична чувствителност 82% и специфичност – 80%. При разделяне по пол маркерът UNC демонстрира AUC-ROC при жени – 0.845, и при мъже – 0.904. Изведените полово диференцирани cut-off стойности за UNC в идентифициране пациенти с повишен ACR сред лицата със ЗД II са: при жени – 6.87 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (диагностична чувствителност и специфичност – 75% и 86%) и при мъже – 3.72 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (диагностична чувствителност и специфичност – 88% и 95%). Така определените полово диференцирани cut-off стойности за разграничаване пациенти със ЗД II с повишен ACR имат отношение на положителна и отрицателна вероятност – при жени – LR+ 5.24, и LR- 0.29 и при мъже – LR+ 16.64 и LR- 0.12, положителната и отрицателната предсказваща стойност – при жени 88% и 72% и при мъже – 94% и 90%, и диагностичната ефективност при жени – 80%, и при мъже – 92% (Фиг. 20).

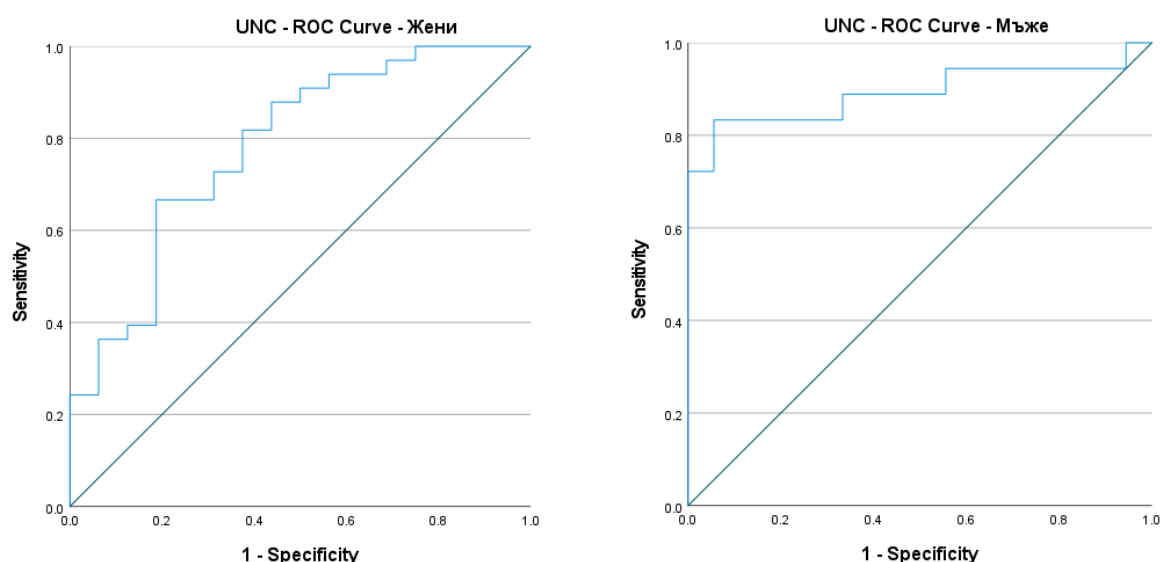


Фигура 20. ROC криви на UNC - жени и при мъже, разграничаващи пациентите със ЗД II с повишен ACR

UNC демонстрира лоша диагностична ефективност в идентифициране на пациентите със ЗД II с намалена гломерулна филтрация ($\text{eGFR} < 60 \text{ ml}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$) (AUC-ROC – 0.578) и не са определени cut-off стойности.

UNC има много добра диагностична ефективност в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II (ЗД без ДБЗ vs ЗД с ДБЗ) с AUC-ROC – 0.851. При cut-off – 4.62 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ маркерът има диагностична чувствителност - 75% и специфичност – 79%. При разделяне по пол UNC демонстрира AUC-ROC при жени – 0.782 и при мъже – 0.892 в идентифициране на лицата с бъбречно увреждане сред пациенти със ЗД II. Изведените полово диференцирани cut-off стойности за ДБЗ на UNC са: при жени – 6.87 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (диагностична чувствителност и

специфичност – 64% и 81%) и при мъже – 3.72 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ (диагностична чувствителност и специфичност – 83% и 94%). Така определените полово диференцирани cut-off стойности за ДБЗ имат отношение на положителна и отрицателна вероятност при жени - LR+ 3.38 и LR- 0.44 и при мъже - LR+ 14.88 и LR- 0.18, положителната и отрицателната предсказваща стойност при жени – 88% и 52% и при мъже – 94% и 85% и диагностичната ефективност при жени - 69 % и при мъже - 89 % (Фиг. 21)



Фигура 21. ROC криви - UNC - жени и мъже, разграничаващи лица със ЗД II с ДБЗ

Статистическата обработка на данните показва, че pNGAL е подходящ маркер за отдиференциране на пациентите със ЗД II с намалена гломерулна филтрация, докато uNGAL и UNC за идентифициране на тези с повишен ACR и за откриване на пациентите със ЗД II с ДБЗ. UNC показва по-добра диагностична надеждност от uNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД II с албуминурия и с ДБЗ (Табл. 10).

Таблица 10. Cut-off стойности за бъбречно увреждане при пациенти със ЗД II

показател	критерий	cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС
pNGAL	eGFR < 60 ml/min/1.73 m ²	121.65 ng/mL	72	12	43	8	9	57%	84%
uNGAL	ACR > 3 g/mol	53.30 ng/mL	85	21	36	4	24	47%	90%
uNGAL	ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 ml/min/1.73 m ²	53.30 ng/mL	85	23	32	2	28	45%	94%
UNC - жени	ACR > 3 g/mol	6.87 $\mu\text{g}/\text{mmol}$	49	21	18	3	7	75%	86%
UNC - мъже	ACR > 3 g/mol	3.72 $\mu\text{g}/\text{mmol}$	36	15	18	1	2	88%	95%
UNC - жени	ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 ml/min/1.73 m ²	6.87 $\mu\text{g}/\text{mmol}$	49	21	13	3	12	64%	81%
UNC - мъже	ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 ml/min/1.73 m ²	3.72 $\mu\text{g}/\text{mmol}$	36	15	17	1	3	83%	94%

Съкращения: ИП – истинско положителни, ИО – истинско отрицателни, ФП – фалшиво положителни, ФО – фалшиво отрицателни, ДЧ – диагностична чувствителност, ДС – диагностична специфичност

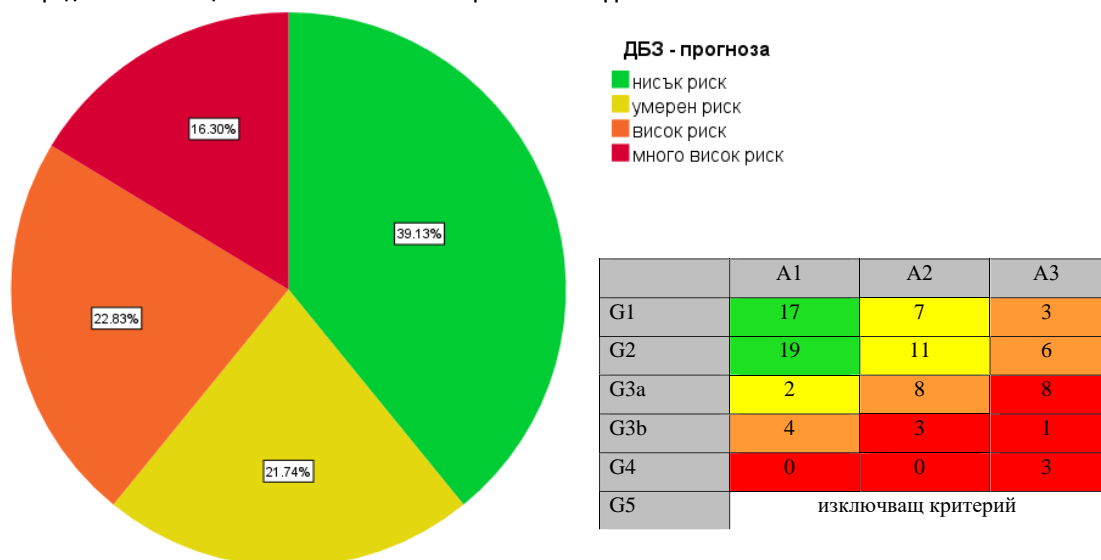
От така изведените данни може да се обобщи, че UNC показва по-добра диагностична ефективност от uNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД II с бъбречно увреждане. Ето защо е предпочетен при оценка ролята на комбинираното приложение на два маркера – pNGAL и UNC. За да се определи значението на pNGAL и UNC за поставяне на диагнозата на ДБЗ при пациенти със ЗД II, дефинирано като $ACR > 3 \text{ g/mol}$ и/или $eGFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ е проведен логистичен регресионен анализ. Когато и двата маркера се отчитат едновременно, те значимо прогнозира наличието на ДБЗ - $\chi^2 = 20.405$, $df = 2$, $p < 0.01$, но независимата променлива pNGAL ($p = 0.503$) не допринася статистически значимо и е изключена. Редуцираният регресионен модел, в който е включен само UNC, е статистически значим и съществено прогнозира наличието на ДБЗ - $\chi^2 = 27.575$, $df = 1$, $p < 0.001$. Моделът обяснява между 28% (Cox & Snell R^2) и 38% (Nadelkerkes R^2) от дисперсията и коректно диагностицира 78% от пациентите със ЗД II спрямо наличието на бъбречно увреждане (79% от пациентите без ДБЗ и 75% от пациентите с ДБЗ). Експонентата на регресионния коефициент $\text{Exp}(B)$ демонстрира, че повишението на UNC с $1 \text{ }\mu\text{g/mmol}$ увеличава шанса пациент със ЗД II да има ДБЗ с 1.29 пъти. След разделяне по пол и повторение на анализа се установи, че регресионният модел е също статистически значим и независим от pNGAL, като UNC значимо прогнозира наличието на ДБЗ сред пациентите със ЗД II (жени - $\chi^2=9.017$, $df=1$, $p=0.003$ и мъже - $\chi^2=23.788$, $df=1$ $p<0.001$), като при жени увеличението на UNC с $1 \text{ }\mu\text{g/mmol}$ повишава вероятността за ДБЗ 1.16 пъти, а при мъже 2.40 пъти. Регресионният модел, който използва само pNGAL за поставяне на диагноза ДБЗ сред пациентите със ЗД II не е статистически значим ($p = 0.121$), а този който използва само uNGAL е с по-малка сила ($\chi^2 = 22.845$, $p < 0.001$).

Оценено е доколко така определената cut-off стойност на pNGAL като маркер за намалена гломерулна филтрация може да подобри диагностичната ефективност на полово диференцираните cut-off стойността на UNC за ДБЗ. Когато и двете cut-off стойности се прилагат едновременно за откриване на ДБЗ, те показват диагностичната чувствителност и специфичност – 89% и 73%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – $LR+$ 3.35 и $LR-$ 0.15 и положителната и отрицателната предсказваща стойност – 84% и 81%. Моделът, при който се прилагат едновременно cut-off стойностите pNGAL >121.65 и/или UNC при жени $> 6.87 \text{ }\mu\text{g/mmol}$ и при мъже $> 3.72 \text{ }\mu\text{g/mmol}$, има диагностична ефективност в идентифициране пациенти със ЗД II с ДБЗ 83% (vs 78% – обща диагностична ефективност на UNC). От така изведените данни може да се обобщи, че pNGAL подобрява, но не и сигнификантно, прогностичната стойност на UNC за откриване на пациенти с ДБЗ сред лицата със ЗД II.

5. Диагностична надеждност на NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ при ЗД II.

Съгласно насоките на KDIGO 2020 пациентите със ЗД II са класифицирани според тежестта и прогнозата на ДБЗ спрямо стойностите на ACR и eGFR. Пациентите са разпределени в 4 групи: с нисък риск (без ДБЗ) – 36 (39.1%), с умерен риск – 20 (21.7%), с висок риск – 21 (22.8%) и с много висок риск – 15 (16.3%) пациенти (Фиг. 22).

Разпределение на пациентите в зависимост от прогнозата на ДБЗ



Фигура 22. Разпределение на пациентите в зависимост от наличието и прогнозата на ДБЗ

Тъй като лошият гликемичен контрол е основен фактор в развитието и прогресията на ДБЗ, е оценена връзката му с нивата на NGAL в плазма и урина. В зависимост от гликемичния контрол, резултатите на пациентите са разделени в две подгрупи, като дефинираната разграничаваща стойност е HbA1c – 7.5%. Характеристиката на пациентите в подгрупите разделени спрямо наличието и прогнозата на ДБЗ е представена в таблица 11 (Табл.11)

Таблица 11. Характеристика на групите пациенти със ЗД II

Категория	Критерий	Mean ± SD	N (жени:мъже)	Години
нисък риск	ACR (g/mol)	1.13 ± 0.50	36 (16:20)	56.58 ± 11.95
	eGFR (ml/min/1.73 m ²)	89.03 ± 15.50		
умерен риск	ACR (g/mol)	10.10 ± 7.88	20 (16:4)	53.15 ± 16.43
	eGFR (ml/min/1.73 m ²)	80.75 ± 20.76		
висок риск	ACR (g/mol)	47.85 ± 80.99	21 (12:9)	63.62 ± 14.37
	eGFR (ml/min/1.73 m ²)	60.90 ± 19.71		
много висок риск	ACR (g/mol)	96.31 ± 92.86	15 (7:8)	61.73 ± 16.86
	eGFR (ml/min/1.73 m ²)	41.40 ± 13.53		
добър контрол	HbA1c ≤ 7.5 %	6.54 ± 0.69	20 (12:18)	61.40 ± 13.38
лош контрол	HbA1c > 7.5 %	10.34 ± 1.92	54 (29:25)	54.76 ± 14.30

pNGAL има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти, разделени в зависимост от прогнозата на ДБЗ: нисък риск – 70.45 (53.42 – 93.80) ng/mL, умерен риск – 75.55 (51.60 – 92.65) ng/mL, висок риск – 114.65 (62.40 – 165.58) ng/mL и много висок риск – 121.80 (74.80 – 191.15) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между отделните подгрупи пациенти ($\chi^2(3) = 8.715$, $p = 0.033$). След приложение на post-hoc тест тази разлика не достигна статистическа значимост за всяко едно сравнение (корекцията на Bonferroni за α при сравнение на 4 групи - статистическата значимост $p \leq 0.008$) (Фиг. 23).

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо HbA1c, са: с добър контрол – 87.60 (58.62 – 165.00) ng/mL, и с лош контрол – 73.80 (54.32 – 122.27) ng/mL. Стойностите на pNGAL в контролната група и в подгрупи пациенти, разделени спрямо гликемичния контрол не се различават сигнификантно помежду ($\chi^2(2) = 3.547$, $p = 0.170$). ROC анализът демонстрира, че pNGAL има лоша диагностична надеждност в идентифициране на пациентите със ЗД II с лош гликемичен контрол (AUC-ROC – 0.488).

С цел да се изследва асоциацията между стойностите на pNGAL и изследваните показатели за бъбречно увреждане и за контрол на ЗД е използван коефициентът на ранговата корелация Spearman Rho. Корелационният анализ показва статистически значима положителна корелация между pNGAL с концентрацията на урея и креатинин в плазма ($\rho = 0.483$, $p < 0.001$ и $\rho = 0.477$, $p < 0.001$) и отрицателна корелация между pNGAL с eGFR ($\rho = -0.460$, $p < 0.001$). Не се установи сигнификантна корелация между pNGAL с ACR, както и с маркерите за метаболитен и гликемичен контрол (Табл. 12).

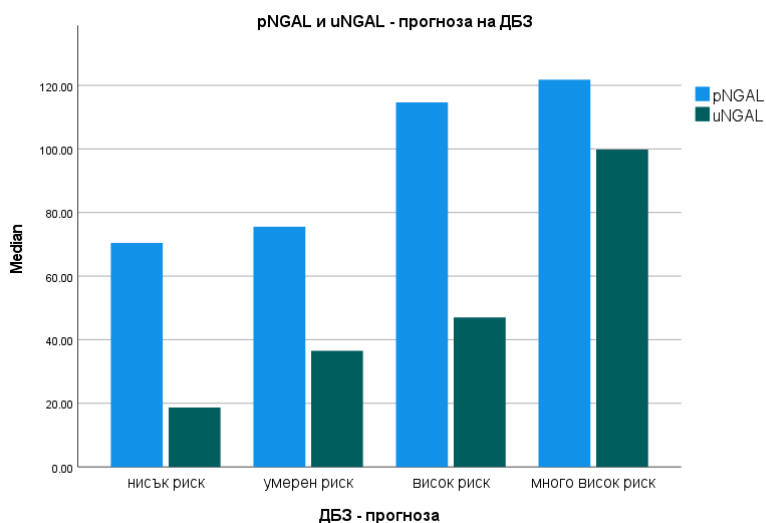
Таблица 12. Корелационна зависимост на pNGAL (Spearman's rho)

		UN	Creat	eGFR	Chol	TG	HDL	LDL	HbA1c	ACR	uNGAL	UNC
pNGAL	rho	0.483	0.477	-0.460	-0.109	-0.010	-0.150	-0.118	-0.206	0.188	0.202	0.128
	p	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.364	0.935	0.219	0.334	0.109	0.116	0.106	0.311

**статистически значима корелация $p < 0.001$

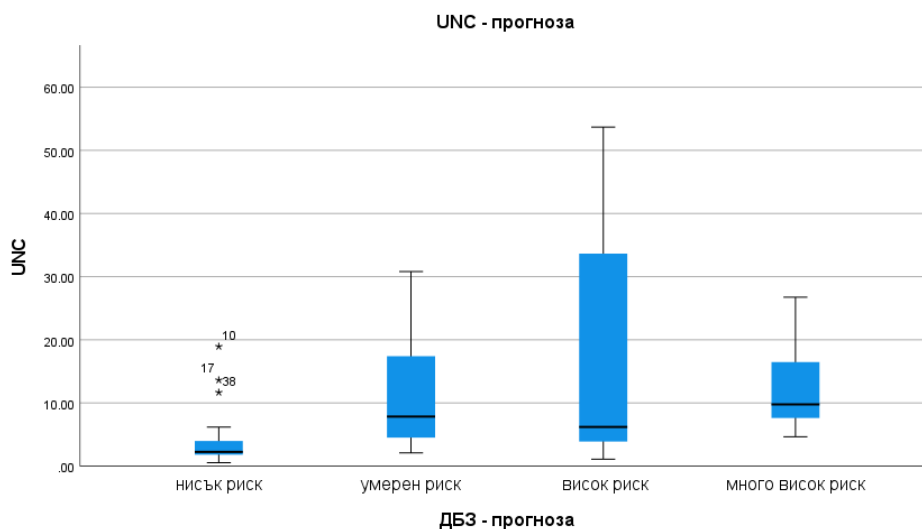
uNGAL има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти, разделени в зависимост от прогнозата на ДБЗ: нисък риск – 18.70 (12.00 – 33.90) ng/mL, умерен риск - 36.50 (24.70 – 62.65) ng/mL, висок риск – 47.00 (15.22 – 102.15) ng/mL и много висок риск – 99.80 (30.20 – 135.20) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между отделните подгрупи пациенти ($\chi^2(3) = 22.855$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест тази разлика се оказва сигнификантна само при сравненията на групата с нисък риск: с умерен риск ($U = 139.00$, $p = 0.001$, $r = -0.446$), висок риск ($U = 167.00$, $p = 0.007$, $r = -0.373$) и много висок риск ($U = 64.00$, p

< 0.001 , $r = -0.594$) (корекцията на Bonferroni за α при сравнение на 4 групи – статистическата значимост $p \leq 0.008$) (Фиг. 23).



Фигура 23. Медиана на pNGAL и uNGAL при пациентите със ЗД II, разделени в зависимост от наличието и прогнозата на ДБЗ

UNC има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти, разделени в зависимост от прогнозата на ДБЗ: нисък риск – 2.26 (1.79 – 4.06) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, умерен риск – 7.85 (4.48 – 18.01) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, висок риск – 6.21 (3.60 – 33.78) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, и много висок риск – 9.77 (7.34 – 18.21) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи статистически значима разлика в резултатите на UNC между групите ($\chi^2(3) = 31.256$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказа сигнификантна само при сравненията на групата с нисък риск: с умерен риск ($U = 82.00$, $p < 0.001$, $r = -0.598$), висок риск ($U = 136.00$, $p = 0.001$, $r = -0.454$) и много висок риск ($U = 41.00$, $p < 0.001$, $r = -0.663$) (Фиг. 24).



Фигура 24. Разпределение на резултатите за UNC при пациентите със ЗД II, разделени в зависимост от наличието и прогнозата на ДБЗ

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо HbA1c, са: добър контрол – 27.10 (18.80-49.50) ng/mL, и с лош контрол – 32.40 (16.32-60.40) ng/mL. Тестът на Mann–Whitney не показва значима разлика в стойностите на uNGAL между подгрупите пациенти ($p = 0.861$), но резултатите на uNGAL във всяка една подгрупа са сигнификантно по-високи спрямо контролната група (добър контрол – $U = 262.0$, $p < 0.001$, $r = -0.385$ и лош контрол – $U = 716.0$, $p < 0.001$, $r = -0.423$). uNGAL демонстрира лоша диагностична ефективност в идентифициране на пациентите със ЗД II с лош гликемичен контрол с AUC-ROC – 0.514.

Съотношението UNC има медиана и интерквартилен обхват в подгрупа с добър гликемичен контрол – 3.98 (1.98-10.30) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, и в подгрупата с лош гликемичен контрол – 4.86 (2.18-13.63) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Не се установи сигнификантна разлика в стойностите на UNC между отделните подгрупи пациенти ($p = 0.452$), но резултатите за UNC във всяка една подгрупа са сигнификантно по-високи спрямо контролната група (добър контрол – $U = 202.0$, $p < 0.001$, $r = -0.464$, и лош контрол – $U = 475.0$, $p < 0.001$, $r = -0.570$). UNC демонстрира лоша диагностична ефективност в идентифициране на пациентите със ЗД II с лош гликемичен контрол с AUC-ROC – 0.559.

Корелационният анализ Spearman Rho показва статистически значима положителна корелация между uNGAL с концентрацията на албумин в урината (AER) ($\rho = 0.610$, $p < 0.001$) и ACR ($\rho = 0.514$, $p < 0.001$) и отрицателна корелация между uNGAL и eGFR ($\rho = -0.232$, $p = 0.033$). Не се установи сигнификантна корелация между uNGAL с маркерите за метаболитен и гликемичен контрол на ЗД. Съотношението UNC корелира значимо положително с AER ($\rho = 0.492$, $p < 0.001$), ACR ($\rho = 0.692$, $p < 0.001$), HbA1C ($\rho = 0.238$, $p = 0.049$) и отрицателно с eGFR ($\rho = -0.265$, $p = 0.014$). Не се установи сигнификантна корелация между UNC с маркерите оценяващи липидния статус (Табл. 13).

Таблица 13. Корелационна зависимост на uNGAL и UNC (Spearman's rho)

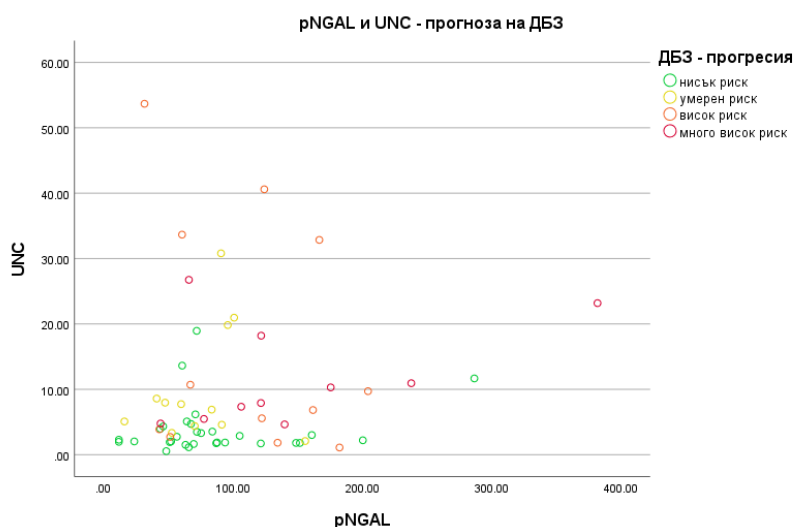
		AER	ACR	eGFR	HbA1c	UN	Creat	Chol	TG	HDL	LDL	pNGAL
uNGAL	rho	0.610	0.514	-0.232	0.060	0.056	0.160	0.112	0.026	0.072	0.024	0.202
	p	<0.001**	<0.001**	0.033*	0.624	0.616	0.144	0.318	0.816	0.529	0.833	0.106
UNC	rho	0.492	0.692	-0.265	0.238	0.103	0.138	0.084	0.084	-0.037	-0.067	0.128
	p	<0.001**	<0.001**	0.014*	0.049	0.349	0.207	0.458	0.455	0.745	0.562	0.311

* статистически значима корелация $p < 0.05$

** статистически значима корелация $p < 0.05$

За да се оцени прогностичната стойност на маркерите pNGAL и UNC в класифицирането на пациентите според тежестта и прогнозата на ДБЗ, е проведен дискриминантен анализ. Анализът констатира, че едновременното използване на двата маркера има по-добра

прогностична стойност от използването им самостоятелно, като и двата маркера са статистически значимо свързани с разпределението на пациентите по групи. Моделът, използващ pNGAL и UNC, е способен статистически значимо да дискриминира групи с ДБЗ – $\lambda=0.665$, $\chi^2=24.904$, $p < 0.001$, $\eta = 0.36$ и обяснява 26.8% от разпределението на пациентите със ЗД по тежест и прогноза на бъбречното увреждане. Дискриминантната функция е: $D = -1.43 + UNC \times 0.068 + pNGAL \times 0.08$. Този модел успешно прогнозира разпределението на 57% от пациентите със ЗД II в съответните групи спрямо степента на бъбречно увреждане. Моделът, който използва само pNGAL, uNGAL или само UNC, прогнозира успешно разпределението съответно на 26%, 42.4% и 49% от пациентите спрямо тежестта и прогнозата на ДБЗ (Фиг. 25).

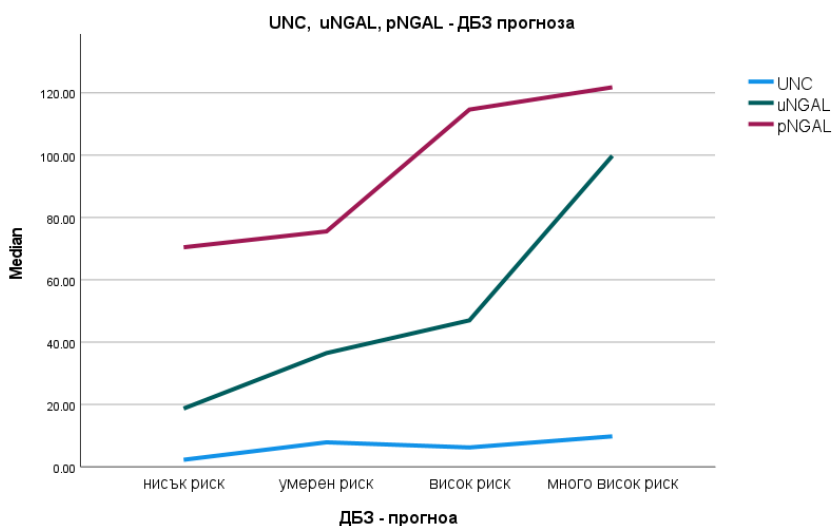


Фигура 25. Разпределение на резултатите за pNGAL и UNC при пациентите със ЗД II, разделени в зависимост от наличието и прогнозата на ДБЗ

За да се оцени вероятността, с която pNGAL и UNC могат успешно да прогнозират наличието на ДБЗ с висок и много висок риск сред пациентите със ЗД II, е проведен логистичен регресионен анализ. Пациентите са разпределени в две групи: първа група с нисък и умерен риск и втора група с висок и много висок риск. Регресионен модел, в който е включен pNGAL и UNC, е статистически значим и съществено прогнозира наличието на ДБЗ с висок и много висок риск – $\chi^2 = 18.558$, $df = 2$, $p < 0.01$, като и двата маркера допринасят статистически значимо за правилното разпределение на пациентите в двете групи. Моделът обяснява между 25% (Cox & Snell R^2) и 34% (Nadelkerkes R^2) от дисперсията и коректно класифицира 75% от пациентите със ЗД II към така дефинираните групи – 91% от пациентите в групата с нисък/умерен риск и 48% от пациентите в групата висок/много висок риск. Експонентата на регресионния коефициент $\text{Exp}(B)$ демонстрира, че повишението на pNGAL с 1 ng/mL увеличава шанса пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск с 1.01 пъти, а повишението на UNC с $1 \mu\text{g}/\text{mmol}$ увеличава вероятността пациент със ЗД II да има ДБЗ с

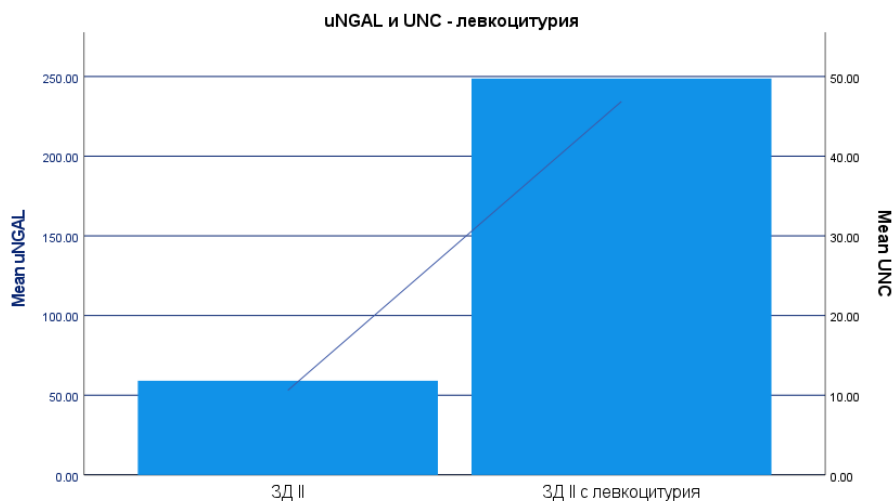
висок и много висок риск с 1.09 пъти (жени – 1.07 пъти, мъже – 1.14 пъти). Моделът, който използва само pNGAL или само UNC коректно класифицира съответно на 66% и 65% от пациентите към групите с нисък/умерен риск и висок/много висок риск.

От така изведените данни може да се обобщи, че при едновременното използване на двата маркера pNGAL и UNC се постига по-коректна оценка на прогнозата на ДБЗ, отколкото при прилагането им самостоятелно (Фиг. 26).



Фигура 26. Промяна в медианата на UNC, uNGAL и pNGAL при прогресия на ДБЗ

Седем от насочените пациенти със ЗД II не отговарят на включващите критерии – при 5-ма е констатирана сигнификантна левкоцитурия (\bar{x} - pNGAL=79.06 ng/mL, uNGAL=248.76 ng/mL и UNC=47.87 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), при един – левкоцитоза (pNGAL=129.00 ng/mL, uNGAL=40.80 ng/mL и UNC=4.73 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), и при един от тях – прием на кортикостероиден препарат (pNGAL=375.20 ng/mL, uNGAL=31.80 ng/mL и UNC=4.55 $\mu\text{g}/\text{mmol}$). Тези пациенти са изключени от статистическата обработка на данните (Фиг. 27).



Фигура 27. Mean - uNGAL и UNC при пациенти със ЗД II без и със левкоцитурия

б. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ при ЗД I

За участие в проучването са насочени 78 деца със ЗД I, но при 3 от тях са констатирани критерии за изключване от групата. Лицата със ЗД I, отговарящи на включващите критерии са 75 пациенти на възраст от 6 до 17 г. (13.38 ± 2.82 г.), с продължителност на ЗД от 5 до 14 г. (7.09 ± 2.59 г.). От включените пациенти в групата 44% (N = 33) са момичета на възраст 13.24 ± 3.13 г. и 56% (N = 42) са момчета на възраст 13.50 ± 2.59 г. Характеристика на пациентската кохорта със ЗД I е представена в таблица 14 (Табл. 14).

Таблица 14. Характеристика на пациентската група със ЗД I

Показател	Пациенти ЗД I mean \pm SD / median (IQR)	Контролна група <18г. mean \pm SD / median (IQR)	P
брой	75	42	
пол момичета:момчета (%)	44%:56 %	50%:50%	= 0.536
години (год.)	13.39 ± 2.82	12.50 ± 3.69	= 0.181
глюкоза (mmol/L)	10.72 ± 5.63	4.69 ± 0.71	< 0.001
урей (mmol/L)	4.70 ± 1.33	3.94 ± 1.05	= 0.006
креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	57.10 ± 13.38	59.66 ± 16.22	= 0.413
eGFR (ml/min/1.73 m ²) _(Bedside Schwartz)	104.04 ± 20.95	*	*
eGFR (ml/min/1.73 m ²) _(CKD-EPI40)	98.35 ± 16.80	94.11 ± 16.42	= 0.318
общ холестерол (mmol/L)	4.48 ± 1.01	4.28 ± 0.96	= 0.420
триглицериди (mmol/L)	1.24 ± 1.41	0.95 ± 0.46	= 0.364
HDL-холестерол (mmol/L)	1.43 ± 0.42	*	*
LDL-холестерол (mmol/L)	2.53 ± 0.86	*	*
AER (mg/l)	38.21 ± 110.07	*	*
HbA1c (%)	8.47 ± 2.10	*	*
ACR (g/mol)	4.75 ± 14.35	*	*
BMI	21.06 ± 4.46	*	*
BMI _(пациент) /BMI _(прицелна за възрастта)	1.12 ± 0.21	*	*
продължителност на диабета	7.09 ± 2.59	*	*
pNGAL (ng/mL)	$66.38 \pm 3.134 / 58.20$ (33.40)	$62.55 \pm 20.16 / 66.15$ (28.45)	= 0.754
uNGAL (ng/mL)	$42.46 \pm 97.88 / 13.00$ (15.00)	$19.96 \pm 13.93 / 13.70$ (10.35)	= 0.683
UNC ($\mu\text{g}/\text{mmol}$)	$5.11 \pm 8.69 / 1.94$ (2.14)	$1.72 \pm 0.90 / 1.47$ (1.06)	= 0.022

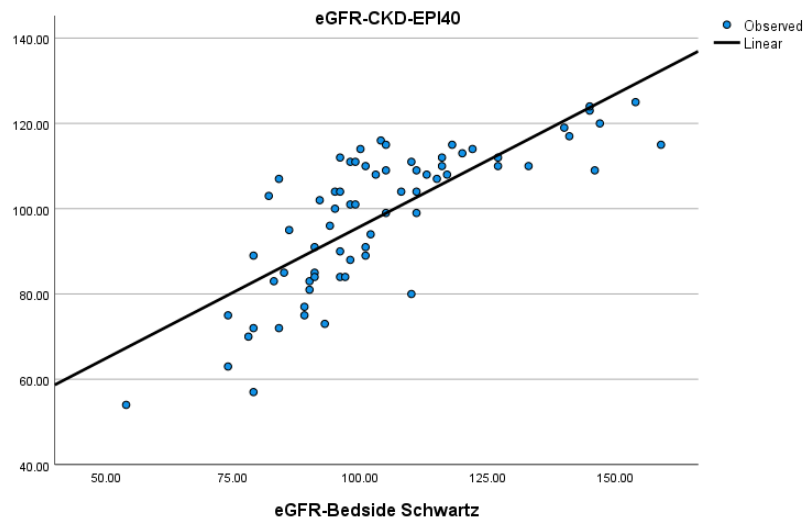
В тази пациентска кохорта се констатира ACR > 30 g/mol при 2 от включените деца. Ето защо пациентските резултати са разделени само в две подгрупи: A1 – при ACR < 3 g/mol, A2 при ACR – 3 – 30 g/mol, като подгрупа A3 не е формирана. Понижение на eGFR < 60 ml/min/1.73 m² е установено само при един от включените пациенти. Ето защо е оценена ролята на pNGAL в диагностиката на гломерулната хиперфилтрация като пациентската кохорта е разделена на две подгрупи според стойностите на eGFR_(Bedside Schwartz) и според

eGFR_(CKD-EPI40), с гранична стойност - 90 ml/min/1.73 m². В зависимост от гликемичния контрол, резултатите на децата със ЗД I са разделени в две подгрупи, като дефинираната разграничаваща стойност е HbA1c – 7.5%. Тъй като само при един пациент е констатирано понижение на eGFR < 60 ml/min/1.73 m², който е и с патологична албуминурия, то е излишно формиране на групи – ЗД I без ДБЗ и ЗД I с ДБЗ, тъй като те са идентични с A1 и A2. Cut-off стойностите изведени в настоящото проучване за идентифициране на патологична албуминурия при пациенти със ЗД I съответстват на cut-off стойности за ДБЗ. Характеристиките на пациентските подгрупи е представена на таблица 15 (Табл. 15).

Таблица 15. Характеристика на групите пациенти със ЗД I

Категория	Критерий	Mean ± SD	N(%)	Години
A1	ACR <3 g/mol	0.84 ± 0.54	53 (72%)	13.19 ± 2.68
A2	ACR – 3 - 30 g/mol	7.00 ± 5.11	19 (25%)	13.84 ± 3.08
A3(не е формирана)	ACR >30 g/mol	87.22 ± 5.75	2 (3%)	16.50 ± 0.71
eGFR _(Bedside Schwartz) ≥90	eGFR ≥90 ml/min/1.73 m ²	110.62 ± 18.39	15 (21%)	13.07 ± 2.87
eGFR _(Bedside Schwartz) <90	eGFR <90 ml/min/1.73 m ²	79.93 ± 8.55	55 (79%)	13.38 ± 2.81
eGFR _(CKD-EPI40) ≥90	eGFR ≥90 ml/min/1.73 m ²	107.52 ± 8.59	24 (32%)	12.96 ± 2.90
eGFR _(CKD-EPI40) <90	eGFR <90 ml/min/1.73 m ²	77.54 ± 9.41	50 (68%)	13.52 ± 2.78
добър контрол	HbA1c ≤7.5 %	6.77 ± 0.63	33 (45%)	13.00 ± 2.65
лош контрол	HbA1c >7.5 %	9.84 ± 1.86	41 (55%)	13.61 ± 2.94

eGFR при пациентите със ЗД I е изчислен с утвърдената формула Bedside Schwartz – GFR_(Bedside Schwartz) и алтернативната формула СКD-EPI40 - eGFR_(CKD-EPI40). С цел да се установи линейната регресия между СКD-EPI40 и формула Bedside Schwartz е проведен единичен регресионен анализ, който показва че eGFR_(Bedside Schwartz) значимо може да прогнозира eGFR_(CKD-EPI40), $F(1.75) = 101.19$, $p < 0.001$. Регресионната константа ($\alpha = 33.97$, $p < 0.001$) и регресионният коефициент ($b = 0.613$, $p < 0.001$) са статистически значими. Намереното уравнение за връзката между резултатите от двете формули е: $eGFR_{(CKD-EPI40)} = 33.97 + 0.613 \times eGFR_{(Bedside\ Schwartz)}$. Стойността на коригирания коефициент на детерминация (adjusted R²) е 0.592, което показва, че 59% от измененията в eGFR_(CKD-EPI40) могат да се обяснят от представения регресионен модел, т. е. от eGFR_(Bedside Schwartz). Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е много по-голяма от типичната големина на ефекта (Фиг. 28).



Фигура 28. Регресионна линия представяща линейната зависимост между $eGFR_{(CKD-EPI40)}$ и $eGFR_{(Bedside\ Schwartz)}$

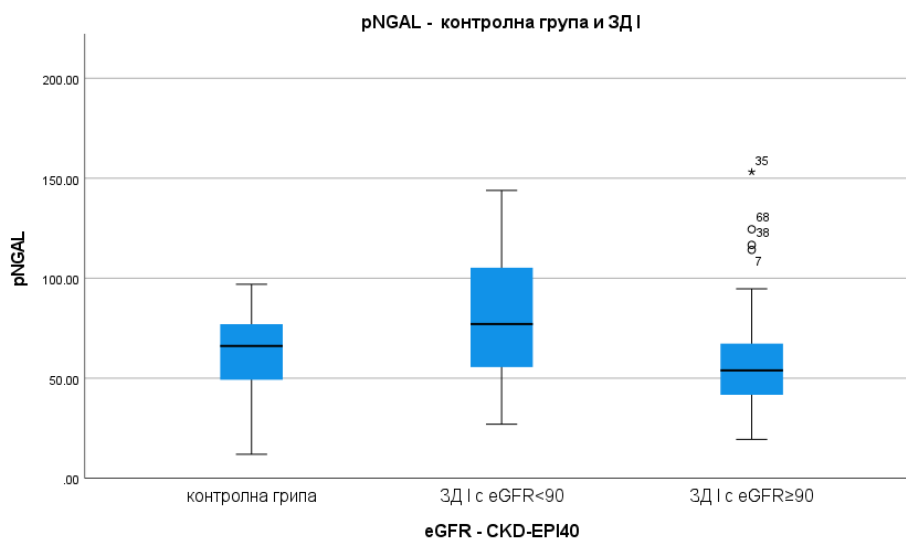
Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите за pNGAL, uNGAL и UNC в цялата кохортата пациенти със ЗД I и в отделните подгрупи показва липса на Гаусово разпределение. Тестът на Shapiro–Wilk’s ($p < 0.05$) демонстрира коефициенти за асиметрия и ексцес със z-value > 1.96 , което отхвърли нулевата хипотеза за нормално разпределение и за трите показателя във всяка една от обследваните подгрупи. Последващата статистическа обработка на данните е извършена с непараметрични методи за анализ.

6.1. pNGAL като маркер за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД I

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в цялата пациентска група е 58.20 (46.70-80.10) ng/mL. Тестът на Mann–Whitney не установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между пациентите със ЗД I и съответната им контролна група ($U = 1369$, $p = 0.754$). Медианата и интерквартилният обхват в двете подгрупи, разделени спрямо ACR, са: при A1 – 57.75 (49.45 – 77.30) ng/mL, и при A2 – 66.50 (35.35– 124.13) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis не установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между контролната група и отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо ACR ($\chi^2(2) = 0.308$, $p = 0.857$).

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо $eGFR_{(Bedside\ Schwartz)}$, са: при $eGFR_{(Bedside\ Schwartz)} \geq 90$ е 56.50 (47.00 – 74.95) ng/mL и при $eGFR_{(Bedside\ Schwartz)} < 90$ е 80.60 (41.75 – 121.75) ng/mL. Стойностите на pNGAL в групата с $eGFR_{(Bedside\ Schwartz)} < 90$ ml/min/1.73 m² са по-високи спрямо резултатите на пациентите $eGFR_{(Bedside\ Schwartz)} \geq 90$, но разликата не достига сигнификантна значимост ($U = 288.5$, $p = 0.110$). При прилагане на алтернативната формула $eGFR_{(CKD-EPI40)}$ за класифициране на пациентските резултати, се установи медиана на pNGAL в групата с $eGFR_{(CKD-EPI40)} \geq 90$ - 53.95 (41.63 – 67.30) ng/mL и в

групата с $eGFR_{(CKD-EPI40)} < 90 - 77.10$ (53.90 – 111.60) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че концентрацията на pNGAL в така дефинираните подгрупи пациенти и контролната група се различават статистически значимо помежду си ($\chi^2(2)=10.082$, $p=0.006$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна само между двете пациентски подгрупи (53.95 vs 77.10 ng/mL), $U=317.0$, $p=0.004$, $r=-0.34$ (Фиг. 29).



Фигура 29. Разпределение на резултатите за pNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД I, разделени спрямо $eGFR_{(CKD-EPI40)}$

Медианата и интерквартилният обхват на pNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо HbA1c, са: добър контрол – 59.00 (50.7 – 93.9) ng/mL, и с лош контрол – 54.90 (41.5 – 77.1) ng/mL. Стойностите на pNGAL между отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо гликемичния контрол, не се различават сигнификантно както помежду си така и спрямо контролната група ($\chi^2(2) = 0.716$, $p = 0.699$).

Корелационният анализ Spearman Rho показва статистически значима отрицателна корелация между pNGAL и $eGFR_{(CKD-EPI40)}$ ($\rho = -0.324$, $p = 0.006$), но не и с $eGFR_{(Bedside Schwartz)}$. Не се установи сигнификантна корелация между pNGAL и ACR, както и с маркерите за метаболитен и гликемичен контрол и с продължителността на ЗД I (Табл. 16).

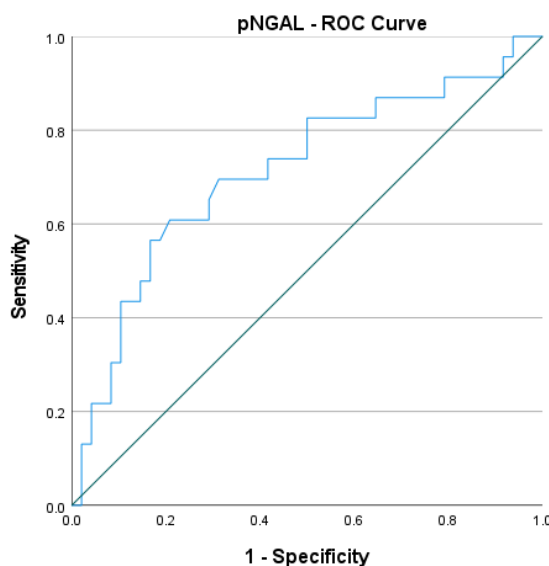
Таблица 16. Корелационна зависимост на pNGAL (Spearman’s rho)

		eGFR		Urea	Creat	Chol	TG	HDL	LDL	BMI	HbA1c	ACR
		CKDEPI	Schwartz									
pNGAL	rho	-0.324	-0.197	-0.214	0.221	-0.047	-0.173	0.118	0.021	0.116	-0.148	-0.180
	p	=0.006*	=0.110	0.076	=0.064	=0.698	=0.152	=0.330	=0.864	=0.354	=0.228	=0.136

* статистически значима корелация $p < 0.05$

ROC анализът демонстрира добра диагностична ефективност на pNGAL в

отдиференциране на пациенти ЗД I с $eGFR_{(CKD-EPI40)} < 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, с AUC-ROC-0.713. При cut-off - 96.80 ng/mL, pNGAL има диагностична чувствителност и специфичност – 30% и 92%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – LR+ 3.66 и LR- 0.76, положителна и отрицателна предсказваща стойност – 64% и 73% и диагностична ефективност 72% в разграничаването на пациентите със ЗД I с $eGFR_{(CKD-EPI40)} < 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ (Фиг. 30).

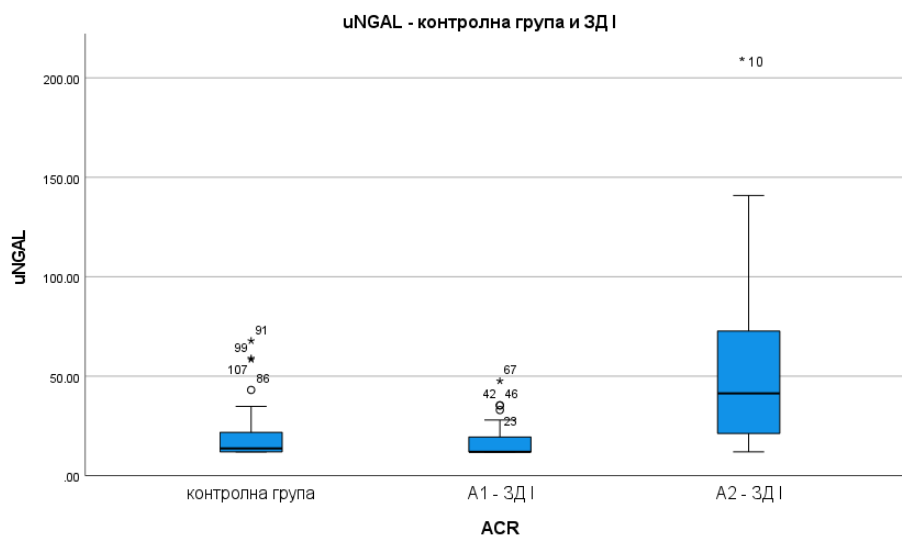


Фигура 30. ROC крива на pNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД I с $eGFR < 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$

6.2. uNGAL и UNC като маркери за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД I

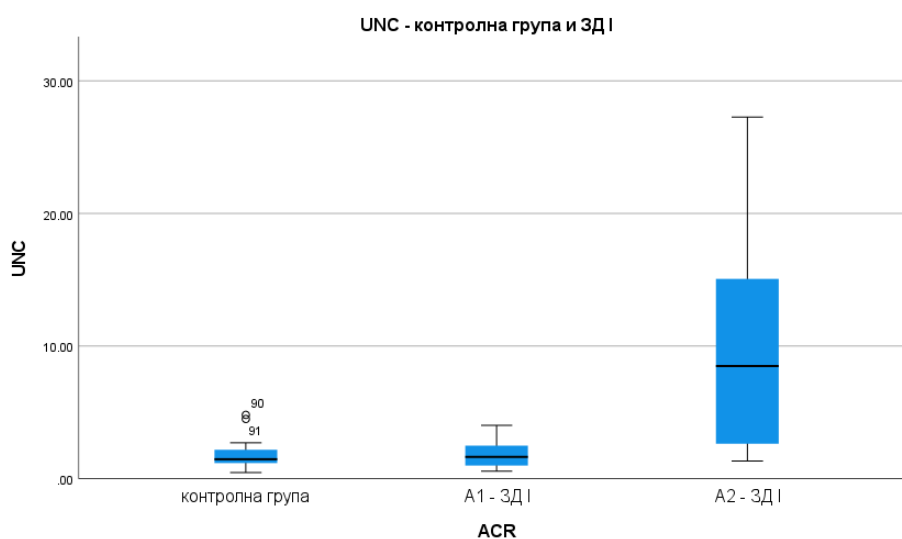
Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL и UNC в цялата пациентска група са 13.00 (12.00 – 27.00) ng/mL и 1.94 (1.18 – 3.32) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Не се установи сигнификантна разлика в концентрацията на uNGAL между пациентите със ЗД I и контролната група ($U=1431$, $p=0.683$). Резултатите за UNC са статистически значимо по-високи при пациентите със ЗД I спрямо контролната група (1.94 vs 1.47 $\mu\text{g}/\text{mmol}$) $U=1107.5$, $p=0.022$, $r = -0.22$.

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в двете подгрупи, разделени спрямо ACR, са: A1 – 12.00 (12.00 – 19.57) ng/mL и A2 – 41.4 (17.60 – 83.70) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че стойностите на uNGAL в контролната група и в отделните подгрупи, разделени спрямо ACR, се различават значимо помежду си ($\chi^2(2) = 20.12$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна за всички сравнения между групите с изключение между A1 и контролната група. Тестът на Mann–Whitney установи статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между отделните подгрупи пациенти със ЗД I (12.00 vs 41.4 ng/mL), $U=179.0$, $p < 0.001$, $r = -0.517$. Спрямо контролната група сигнификантно по-високи резултати имат само пациентите от подгрупа A2 (41.4 vs 13.70 ng/mL), $U = 184.5$, $p < 0.001$, $r = -0.431$ (Фиг. 31).



Фигура 31. Разпределение на резултатите за uNGAL при контролната група и при пациентите със ЗД I, разделени спрямо ACR

Съотношението UNC има следните стойности за медиана и интерквартилен обхват в отделните подгрупи пациенти: A1 – 1.64 (0.98 – 2.54) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, и A2 – 8.49 (2.50 – 15.32) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis установи, че стойностите на UNC в контролната група и в отделните подгрупи разделени спрямо ACR се различават значимо помежду си ($\chi^2(2)=26.35$, $p < 0.001$). След приложение на post-hoc тест, тази разлика се оказва сигнификантна за всички сравнения между групите с изключение на A1 и контролната група. Тестът на Mann–Whitney установи статистически значима разлика в стойностите на UNC между двете пациентски подгрупи (1.64 vs 8.49 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U=139.0$ $p<0.001$ $r=-0.547$. Спрямо контролната група сигнификантно по-високи резултати имат единствено пациентите в A2 (8.49 vs 1.47 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U=84.0$, $p<0.001$, $r = -0.626$ (Фиг. 32).

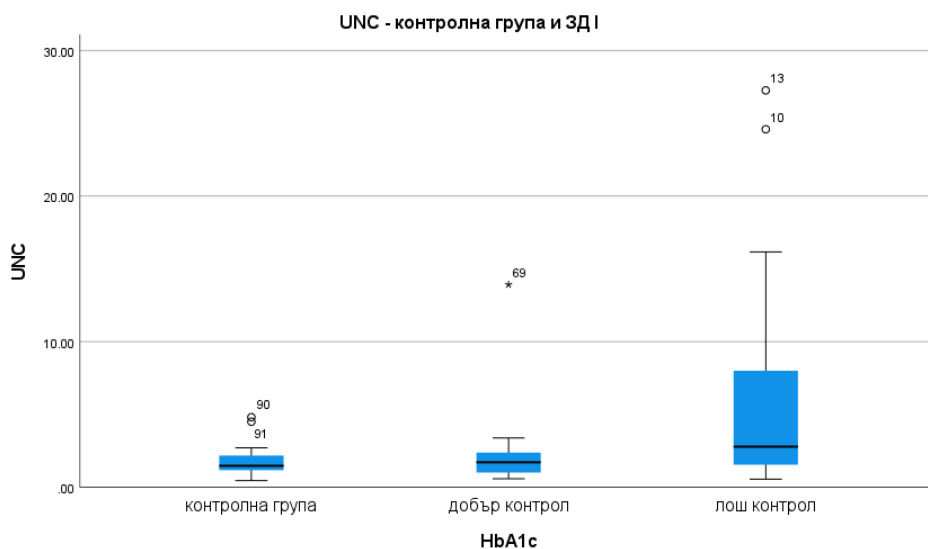


Фигура 32. Разпределение на резултатите за UNC при контролната група и при пациентите със ЗД I, разделени спрямо ACR

Не се установи статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между контролната група и отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо eGFR_(Bedside Schwartz) ($\chi^2(2)=0.492$, $p=0.782$), както и спрямо eGFR_(СКД-ЕРІ40) ($\chi^2(2)=2.115$, $p=0.347$). Тестът на Kruskal–Wallis установи, че стойностите на UNC в контролната група и в отделните подгрупи, разделени спрямо eGFR_(Bedside Schwartz), както и спрямо eGFR_(СКД-ЕРІ40), се различават помежду си, но след приложение на post-hoc тест тази разлика не достигна статистическа значимост за всяко едно сравнение (корекцията на Bonferroni за α при сравнение на 3 групи – статистическата значимост $p \leq 0.017$).

Медианата и интерквартилният обхват на uNGAL в двете подгрупи пациенти, разделени спрямо HbA1c, са: добър контрол – 12.00 (12.00 – 20.90) ng/mL, и с лош контрол – 16.10 (12.00 – 39.90) ng/mL. Тестът на Kruskal–Wallis не установи статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между контролната група и отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо HbA1c ($\chi^2(2) = 4.661$, $p = 0.097$).

Съотношението UNC има медиана в подгрупата с добър гликемичен контрол – 1.71 (0.99 – 2.39) $\mu\text{g}/\text{mmol}$, и в подгрупата с лош гликемичен контрол – 2.79 (1.55 – 8.25) $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Тестът на Kruskal–Wallis показва статистически значима разлика между контролна група и пациенти със ЗД с добър и с лош контрол ($\chi^2(2) = 12.86$, $p = 0.002$). След приложение на post-hoc тест се установи, че пациентите с лош гликемичен контрол имат сигнификантно по-високи резултати както спрямо контролната група, така и спрямо тези с добър контрол на ЗД I (2.79 vs 1.47 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 468.0$, $p < 0.001$, $r = -0.369$ и (2.79 vs 1.71 $\mu\text{g}/\text{mmol}$), $U = 396.0$, $p = 0.006$, $r = -0.326$ (Фиг. 33).



Фигура 33. Разпределение на резултатите за UNC при контролната група и при пациентите със ЗД I, разделени спрямо HbA1c

Корелационният анализ на Spearman показва статистически значима положителна корелация между uNGAL с AER ($\rho = 0.408$, $p < 0.001$), ACR ($\rho = 0.389$, $p < 0.001$), HbA1c ($\rho = 0.255$, $p = 0.031$), BMI ($\rho = 0.273$, $p = 0.025$), триглицериди ($\rho = 0.262$, $p = 0.027$) и възраст ($\rho = 0.250$, $p = 0.033$). UNC корелира положително сигнификантно с ACR ($\rho = 0.641$, $p < 0.001$), AER ($\rho = 0.250$, $p = 0.033$), HbA1c ($\rho = 0.435$, $p < 0.001$) и триглицериди ($\rho = 0.396$, $p < 0.001$). Не се установи значима корелация както на uNGAL, така и на UNC с $eGFR_{(\text{Bedside Schwartz})}$ и $eGFR_{(\text{CKD-EPI40})}$, както и с продължителността на ЗД I (Табл. 17).

Таблица 17. Корелационна зависимост на uNGAL и UNC (Spearman's rho)

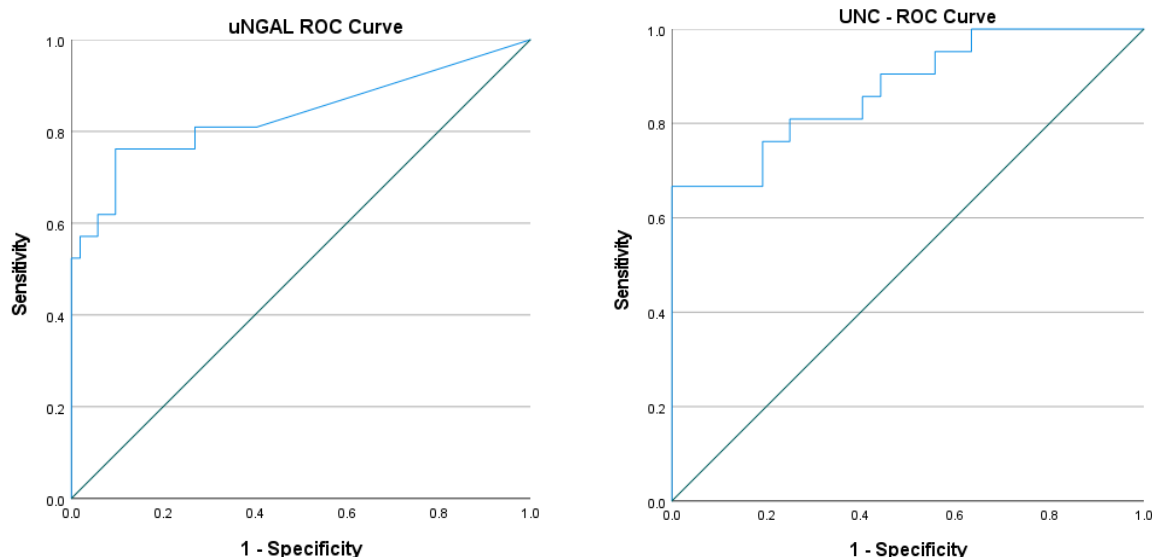
		AER	ACR	HbA1c	Chol	TG	HDL	LDL	BMI	pNGAL	eGFR	
											Schwartz	CKDEPI
uNGAL	rho	0.408	0.389	0.255	0.142	0.262	-0.089	0.066	0.273	0.042	0.036	0.115
	p	<0.001**	<0.001**	=0.031*	=0.237	=0.027*	=0.459	=0.584	=0.025*	=0.732	=0.771	=0.336
UNC	rho	0.250	0.641	0.435	0.163	0.396	-0.152	0.081	0.178	-0.172	0.081	0.194
	p	=0.033*	<0.001**	<0.001**	=0.176	<0.001**	=0.207	=0.500	=0.149	=0.157	=0.510	=0.102

* статистически значима корелация $p < 0.05$

** статистически значима корелация $p < 0.01$

ROC анализът демонстрира много добра диагностична ефективност на uNGAL в отдиференциране на пациенти със ЗД I с повишен ACR (A1 vs A2/A3), с AUC-ROC – 0.836. При cut-off – 47.85 ng/mL, стойност над определената горна референтна граница, uNGAL има диагностична чувствителност и специфичност съответно - 52% и 100%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – $LR+ > 52.00$ и $LR- 0.48$ и положителна и отрицателна предсказваща стойност – 100% и 84%, в разграничаване на пациентите със ЗД I с $ACR > 3$ g/mol. Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 47.85 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД I с албуминурия е 86%. Така определената cut-off стойност може да се приеме като гранична стойност за ДБЗ при деца със ЗД I (Фиг. 34).

Съотношението UNC показва много добра диагностична точност в отдиференцирането на пациентите със ЗД I с албуминурия (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.873. Cut-off стойността, която има най-добри диагностични характеристики в отдиференциране на пациентите със ЗД I с $ACR > 3$ g/mol, е 3.86 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, с диагностична чувствителност и специфичност – 67% и 98%, отношение на положителна и отрицателна вероятност – $LR+ 35.10$ и $LR- 0.34$ и положителна и отрицателна предсказваща стойност – 93% и 88%. Диагностичната ефективност, с която стойност на UNC > 3.86 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД I с албуминурия е 89%. Така определената cut-off стойност може да се приеме като гранична стойност за ДБЗ при деца със ЗД I (Фиг. 34).



Фигура 34. ROC криви на uNGAL и UNC в разграничаване на пациентите със ЗД I с повишен ACR

Статистическата обработка на данните показва, че pNGAL е подходящ маркер за отдиференциране на пациентите със ЗД I с леко понижена гломерулна филтрация, докато uNGAL и UNC за идентифициране на тези с повишен ACR и за откриване на ДБЗ сред пациентите със ЗД I. Определените cut-off стойности за бъбречно увреждане при пациенти със ЗД I са представени в Таблица 18 (Табл. 18).

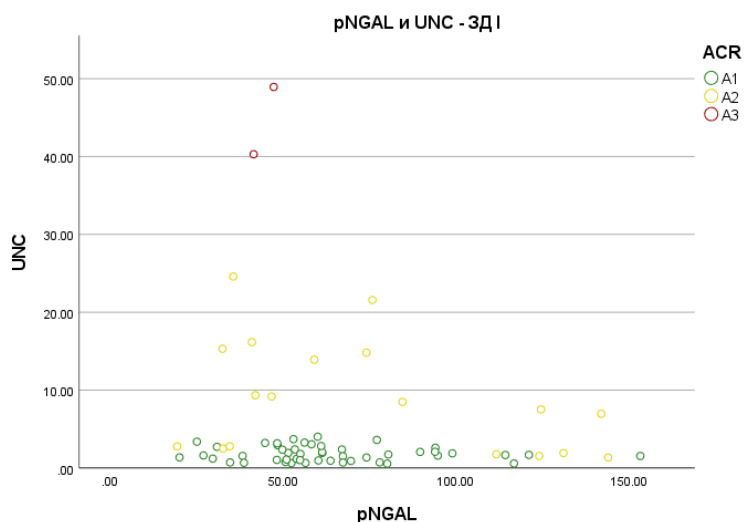
Таблица 18. Обобщено представяне на Cut-off стойностите при пациенти със ЗД I, изведени в настоящото проучване

показател	критерий	cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС
pNGAL	eGFR<90ml/min/1.73 m ²	96.80 ng/mL	71	7	44	4	16	30%	92%
uNGAL	ACR>3 g/mol	47.85 ng/mL	73	11	52	0	10	52%	100%
UNC	ACR>3 g/mol	3.86 µg/mmol	73	14	51	1	7	67%	98%

Съкращения: ИП – истинско положителни, ИО – истинско отрицателни, ФП – фалшиво положителни, ФО – фалшиво отрицателни, ДЧ – диагностична чувствителност, ДС – диагностична специфичност

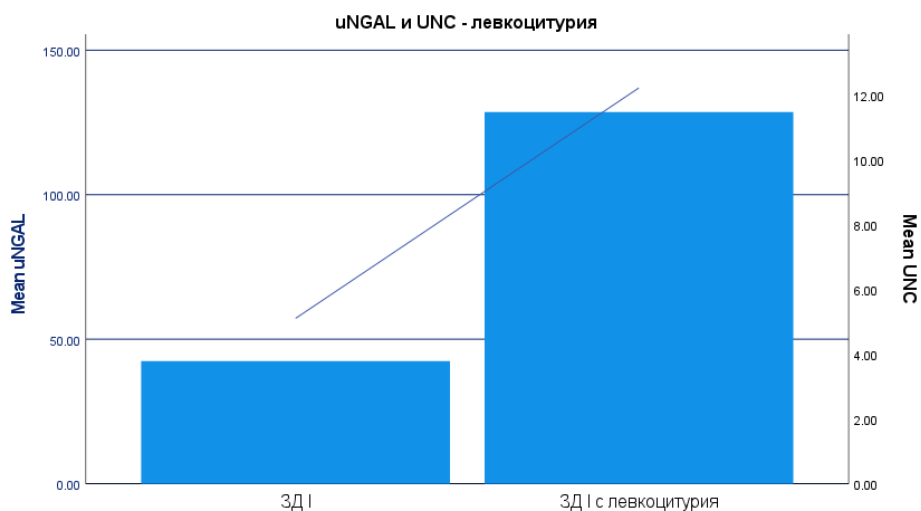
От така изведените данни може да се обобщи, че UNC показва по-добра диагностична ефективност от uNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД I с бъбречно увреждане, ето защо е предпочетен при оценка ролята на комбинираното приложение на два маркера pNGAL и UNC. За да се определи значението на pNGAL и UNC за поставяне на диагнозата на ДБЗ при пациенти със ЗД I, дефинирано като ACR > 3g/mol, е проведен логистичен регресионен анализ. Когато и двата маркера се отчитат едновременно, те значимо прогнозира наличието на ДБЗ – $\chi^2=44.285$, $df=2$, $p < 0.01$, като независимата променлива pNGAL ($p = 0.037$) допринася статистически значимо, но не подобрява значимо модела. Редуцираният регресионен модел, в който е включен само UNC, е статистически значим и съществено прогнозира наличието на ДБЗ – $\chi^2=43.505$, $df=1$, $p<0.001$. Моделът обяснява между 45% (Cox & Snell R²) и 64%

(Nadelkerkes R^2) от дисперсията и коректно диагностицира 90% от пациентите със ЗД I спрямо наличието бъбречно увреждане (99% от пациентите без ДБЗ и 67% от пациентите с ДБЗ). Експонентата на регресионния коефициент $\text{Exp}(B)$ демонстрира, че повишението на UNC с 1 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ увеличава шанса пациент със ЗД I да има ДБЗ с 2.1 пъти. Регресионният модел, който използва само pNGAL за поставяне на диагноза ДБЗ сред пациентите със ЗД I, не е статистически значим ($p = 0.321$), а този само uNGAL има по-малка сила ($\chi^2 = 34.200, p < 0.001$) (Фиг. 35).



Фигура 35. Разпределение на резултатите за pNGAL и UNC при пациентите със ЗД I, разделени в зависимост от стойностите на ACR (ДБЗ)

При трима от насочените пациенти със ЗД I се констатира сигнификантна левкоцитурия и са изключени от последващата обработката на данните (\bar{x} - $\text{pNGAL}=73.06 \text{ ng/mL}$, $\text{uNGAL}=128.60 \text{ ng/mL}$ и $\text{UNC}=12.23 \mu\text{g}/\text{mmol}$) (Фиг. 36).



Фигура 36. Mean - uNGAL и UNC при пациенти със ЗД I без и със левкоцитурия

V. ДИСКУСИЯ

1. Верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL

NGAL Test™ на фирма Bioporto е латекс усилен имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL с адаптации и приложения за различни аналитични платформи. Времето за измерване на NGAL на биохимичен анализатор ADVIA 1800, с който е извършен анализа в проучването, е 10 мин. NGAL Test™ е насочен към диагностика на ОБУ и има измервателен диапазон 25 – 3000 ng/mL, което позволява количествено определяне на по-голям диапазон от стойности при тази таргетна група пациенти. Тези характеристики определят приложимостта на теста в клиничната практика и в диагностиката на ОБУ. Целевите групи в настоящото проучване са здрави лица и пациенти със ЗД с и без бъбречно увреждане. Данните в литературата сочат, че при част от здравите лица и при част от пациентите със ЗД без ДБЗ, може да се очакват концентрация на NGAL в урината около и под долната граница на количествено определяне на NGAL Test™. С оглед оптимизиране на теста за целите на проучването е извършена верификация на метода и е изчислен и проверен аналитичният измервателен диапазон. В Таблица 19 са представени аналитичните характеристики на NGAL Test™ за анализатор ADVIA 1800, по данни на фирма Bioporto, резултатите получени в настоящото проучване и допустимите критерии, използвани при оценка на аналитичните характеристики на методът (Табл. 19).

Таблица 19. Аналитични характеристики на NGAL Test™ на платформа ADVIA 1800

Оценявана характеристика	Показател	Bioporto	Проучване	Критерий
Откриваем минимум	LLOD	12 ng/mL	6 ng/mL	3*SD-blank*
Линейност	LLOQ-ULOQ	25–3000 ng/mL	12–3000 ng/mL	< 20% – < 15%*
Невъзпроизводимост в серия – урина/ниска	CV%	*	6.43%	< 20%*
Невъзпроизводимост в серия – плазма/ниска	CV%	9.6%	5.26%	< 20%*
Невъзпроизводимост в серия – плазма/кл. значима	CV%	*	1.85%	< 20%*
Невъзпроизводимост в серия – плазма/висока	CV%	*	1.82%	< 20%*
Невъзпроизводимост във време – ниска контрола	CV%	1.7%	4.5%	< 20%*
Невъзпроизводимост във време – висока контрола	CV%	0.9%	2.7%	< 20%*
Недостоверност с ниска контрола	d%	*	0.34	<10%, Westgard rules
Недостоверност с висока контрола	d%	*	0.40	<10%, Westgard rules
Аналитична откриваемост - плазма	% recovery	*	98% (95:101)	80 – 120%**
Аналитична откриваемост - урина	% recovery	*	98%	80 – 120%**
Пренос на биологичен материал	% Carryover	*	-0.29%	<20% of LLOQ*

* EMEA/CHMP/EWP/2009 - Guideline on bioanalytical method validation

** Practical Guide to Immunoassay Method Validation

Верификацията на NGAL Test™ е извършена според насоките на ISO 17025 – Requirements for Method Verification, като критериите за приемливост на аналитичните характеристики са съобразени с EMEA/CHMP/EWP/2009 Guideline on bioanalytical method validation. Аналитичната надеждност на метода е определена, като е оценено и влиянието на биологичния материал върху изследваните характеристики. При оценка на измервателния диапазон се установи стойност на LLOD равна на 6.00 ng/mL и на LLOQ равна на 12.00 ng/mL. Получените коефициенти на вариация при проверка на LLOQ ($x_0=12.00$ ng/mL – CV=17.52%) и ULOQ ($x_0=3000.00$ ng/mL – CV=1.55%) са в съответствие с международните изисквания и за целите на проучване е приложена линейност на NGAL Test™ на биохимичен анализатор ADVIA 1800 от 12.00 до 3000.00 ng/mL. За оценка на случайната грешка е обследвана възпроизводимост в серия и възпроизводимост във време. Данните от статистическата обработка показват много добра възпроизводимост в серия с коефициенти на вариация в ниска-референтна, клинично значима и патологична област значително по-ниски от допустимият критерий. Изведените CV% при изследване на възпроизводимост във време удовлетворяват както производствено обявените аналитични характеристики (CV%<5%), така и международните изисквания. При оценка на недостоверност се констатира ниска стойност на d% като мярка за системна грешка и висока аналитична откриваемост като мярка за пропорционалната системна грешка. Данните от % Carryover демонстрират, че анализаторът осигурява много добро разделяне на пробите, без пренос на биологичен материал между тях. При верифициране на метода латекс усилен имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL на фирма Biorpoto на биохимичен анализатор ADVIA 1800 са констатирани много добри аналитични характеристики, в съответствие с производствено обявените и международните стандарти. Тестът показва висока аналитична надеждност при определяне на NGAL както в плазма, така и в урина. Въпреки това NGAL Test™ не успява да детектира с необходимата точност концентрации на анализа < 12 ng/mL, каквито стойности се очакват при част от здравите лица. Резултатите за възпроизводимост в серия в ниската област имат по-голямо разсейване спрямо тези в референтната и патологичната област, което е независимо от използвания биологичен материал. Установи се по-висок CV% при оценка на невъзпроизводимост във време с контролния материал в по-ниската концентрационна област. Следователно NGAL Test™ показва по-добри аналитични характеристики при определяне на високи в сравнение с ниски концентрации на анализа и е подходящ тест за детекция на патологични стойности, каквито се очакват при пациентите с бъбречно увреждане.

2. Референтни граници на NGAL. Биологична вариация

Към момента няма налични международни препоръки или насоки при анализа на NGAL, липсва достатъчно информация за биологичната вариация, източници на аналитична интерференция и оптималния биологичен материал за анализ. По-голяма част от посочените в литературата „нормални стойности“ са измерени в относително големи групи, включени в клинично проучване като контролна група. Липсват големи многоцентрови проучвания за извеждане на референтни граници на NGAL стратифицирани според възрастта, пола и етническата принадлежност.

С оглед липсата на стандартизация референтните граници на pNGAL и uNGAL са в зависимост от използвания метод, платформа, биологичен материал за анализ, подбора и разпределението на референтната група. Стойностите на UNC между различните проучвания се влияят допълнително и от аналитичния метод при определяне на креатинин в урината и от използваните мерни единици. В част от цитираните проучвания UNC е представен в ng/mg (или µg/g), конверсионният фактор за преизчисление на UNC от ng/mg в µg/mmol е 0.113 (1/8.842). Сравнителен анализ, оценяващ възпроизводимостта между няколко налични в търговската мрежа анализи за NGAL, докладва добра сравнимост между резултатите получени от Bioporto ELISA и Bioporto PETIA и значими разлики с другите имуноанализи. Авторите посочват за неприложимо сравнението на резултатите от различни проучвания, при които се използват различни методи и аналитични платформи и подчертават необходимостта от хармонизиране и стандартизиране на анализа преди този биомаркер да влезе в рутинна практика.

2.1. Референтни граници на NGAL при възрастни. Биологична вариация

Подходящият материал за анализ при изследване на циркулиращите нива на NGAL е плазмата. Серумът не се препоръчва, тъй като могат да се отчетат фалшиво по-високи резултати поради дегранулация на неутрофилите по време на съсирването. Сравнителен анализ между нивата на NGAL в EDTA и хепаринова плазма отчита по-високи стойности при използване на антикоагуланта литиев хепарин. Авторите препоръчват използване на идентичен биологичен материал при сравнение на резултатите. Производителя BioPorto, с който е извършен анализа, докладва очаквани стойности за pNGAL в EDTA плазма 37 – 106 ng/mL (n = 80). Те посочват следната линейна регресия $NGAL(\text{хепарин}) = 1.01 \times NGAL(\text{EDTA}) + 16.6$ ($r^2 = 0,998$) и уточняват, че NGAL може да бъде анализиран от хепаринова плазма заедно с останалите биохимични параметри, което го прави подходящ показател в условия на спешност. В настоящото проучване е избрана хепаринова плазма като материал за анализ при определяне на циркулиращите нива на NGAL. Този биологичен материал е предпочетен, тъй

като позволява едновременно измерване концентрацията на pNGAL и тази на стандартни и рутинно използвани маркери за бъбречно увреждане. Така изведените референтни граници ще оптимизират клиничната приложимост на NGAL TestTM и правилната интерпретация на резултатите за pNGAL.

Референтните граници на NGAL при възрастни са определени в кохорта от 85 здрави лица на възраст от 34 – 75 г., чрез имунотурбидиметричен анализ. Определеният референтен интервал на pNGAL при възрастни лица е 25 – 119.49 ng/mL, не се установи сигнификантна разлика в стойностите на pNGAL между мъже и жени. Получените от нас резултати са сравними с данните в литературата, при които pNGAL е измерен с идентичен реактив и методология. Xiang D et al. (2013) определят нивата на NGAL в серум, чрез усилен с частици имунотурбидиметричен анализ (PETIA), сред 454 здрави доброволци, на възраст между 21 – 75 г. Те посочват като горна граница на референтния интервал – 122.57 µg/l, въз основа на 95 –ия перцентил. Makris K et al. (2015) определят концентрацията на NGAL в EDTA плазма, чрез PETIA сред 200 здрави лица на възраст 18 – 65 г. Те докладват полово зависими референтни граници за pNGAL, съответстващи на 5-ия и 95-ия перцентил: при мъже – 38.7–157.6 ng/mL, и при жени – 24.4–142.5 ng/mL. В проучването на И Петрова и сътр. (2018), дефинираната контролна група от 16 лица има изходни стойности на pNGAL 82.49 ± 18.82 ng/mL, оценена в EDTA плазма чрез PETIA (Табл. 20).

При обработката на данните в настоящото проучване се констатира положителна корелация между стойностите на pNGAL и възрастта и отрицателна между eGFR и pNGAL. Установи се, че с увеличение на възрастта се наблюдава сигнификантно понижение на eGFR, което съответства на повишението на pNGAL. Най-ниска средна стойност на eGFR е отчетена при лицата > 60 г, което е паралелно на по-високите стойности на pNGAL в тази възрастова декада. Диференцирането на контролната кохорта по-възраст доведе до намаляване на броя лица в отделните групи, което намали статистическата значимост на данните и ограничи възможността за извеждането на възрастово зависими референтни граници. Установената от нас положителна корелация между pNGAL и възрастта се цитира в част от проучванията. Xiang D et al, (2013) констатираат сигнификантна разлика в стойностите на pNGAL между лицата под и над 45 г., като дефинират горна граница на референтния интервал в групата под 45 години < 116.52 µg/L и в групата над 45 години < 126.9 µg/. Makris K et al установяват слаба, но значима корелация между pNGAL и възрастта ($\rho = 0.177$, $p = 0.01$) (Табл. 20). Наблюдаваната тенденция може да се обясни с физиологичните, възрастово обусловени промени в гломерулната филтрация, които са причина за повишение на циркулиращите нива на NGAL. С напредване на възрастта се развива фиброза на интимата на интерлобуларните артерии, която създава хипоксично-исхемична среда и води до гломерулосклероза и

последващата функционална недостатъчност с понижаване на гломерулната филтрация. NGAL е белтък с ниска молекулна маса, който се изчиства от циркулацията чрез бъбречна екскреция, като се подлага на гломерулна филтрация с последваща тубулна реабсорбция. Следователно всяко намаление на гломерулната филтрация намалява екскрецията на NGAL с последващо повишение в системното кръвообращение.

Таблица 20. Референтни граници за pNGAL при възрастни лица

Проучване	Брой	Материал	Метод	Единици	РГ	РГ-възраст	РГ-пол (м/ж)
BioPorto PI, 2011	80	EDTA-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	37 – 106	не	не
Xiang D, 2013	454	серум	PETIA BioPorto	µg/l	< 122.6	<44г. <116.5 >45г. <126.9	не
Makris K, 2015	200	EDTA-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	28.7– 167.0	не ¹	38.7–157.6/ 24.4–142.5
Петрова И, 2018	16	EDTA-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	82.5 ± 18.8	не	не
Настоящото проучване	85	heparin-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	25 – 119.5	не ¹	не

¹ установена е сигнификантна положителна корелация между pNGAL и възрастта
РГ – референтни граници

Към момента няма ясни насоки дали нормализирането чрез съотношението UNC подобрява диагностичната надеждност на uNGAL като тубуларен биомаркер. Delanaye P et al. (2011) оценяват биологичната интраиндивидуална вариация на uNGAL и UNC в проби от първа сутрешна и случайна порция урина и констатира наличието на значима разлика в стойностите на uNGAL (CV – 94%, 132%). Те препоръчват да се използва съотношението UNC, с цел избягване на дневната вариация в стойностите на uNGAL, поради разлика в осмоларитета на урината. Авторите акцентират върху предимствата на UNC в сравнение с абсолютните стойности на uNGAL в условия на спешност, когато се използва случайна порция урина. В настоящото проучване е избрана първа сутрешна урина като материал за анализ при определяне нива на uNGAL. С оглед трудното събиране на диурезна урина е предпочетена единична порция първа сутрешна урина, която е и стандартен материал за рутинно прилагания уринен анализ. Резултатите за UNC са представени в µg/mmol.

Определената от нас горна граница на референтния интервал на uNGAL в първа сутрешна урина при възрастни лица е 52.37 ng/mL, не се констатира сигнификантна разлика в резултатите за uNGAL между двата пола. Обработката на данните показва статистически значима разлика в резултатите за UNC между мъже и жени и са определени пополово зависими референтни стойности: при жени < 6.34 µg/mmol и при мъже < 3.36 µg/mmol.

Makris K et al. (2015) определят концентрацията на uNGAL в случайна порция урина сред 200 здрави лица на възраст 18 – 65 г., чрез PETIA и посочват, като горна граница на референтния интервал 54.5 ng/mL. Schinstock et al. (2013) измерват uNGAL в диурезна урина

чрез ELISA при 125 здрави доброволци, на възраст между 22 – 77 г. Те установяват статистически значима разлика в стойностите на uNGAL и UNC между двата пола и дефинират като горна граница на референтния интервал на uNGAL: при жени – 65 ng/mL и при мъже – 23.4 ng/mL и на UNC: при жени \leq 89.9 ng/mg и при мъже \leq 27.2 ng/mg. В изследването на Ж. Христова и сътр. (2015) са определени референтни граници на uNGAL и UNC, измерени в първа сутрешна урина, чрез ELISA метод сред 80 здрави лица на възраст 21 – 47 г. Те констатираат сигнификантна разлика в стойностите между двата пола и дефинират полово зависими референтни стойности за uNGAL: при жени – 0.16 – 73.04 ng/mL и при мъже – 5.54 – 23.86 ng/mL, и за UNC при жени – 0.08 – 42.8 ng/mg, и при мъже – 5.24 – 20.72 ng/mg. Определената в настоящото проучване горната граница на референтния интервал за uNGAL е сравнима с резултатите в проучването на Makris K et al. (2015), в което е използван идентичен реактив и методология. Близки до получените от нас резултати са и полово диференцираните референтните граници на uNGAL и UNC от Schinstock et al. (2013) и Ж. Христова и сътр. (2015), при които е използван ELISA метод на същия производител. Значимо по-високи референтни стойности са измерени в проучването на Cullen MR et al. (2012) чрез хемилуминисцен имуноанализ uNGAL < 107 μ g/l и UNC < 13 μ g/mmol и в проучването на Pennemans et al. (2013), в което анализът е извършен чрез ELISA тест на друг производител (от 2 до 5 пъти по-високи). И двете проучвания потвърждават наличието на сигнификантна разлика в концентрацията на uNGAL спрямо пола и възрастта (Табл. 21, 22).

Таблица 21. Референтни граници за uNGAL при възрастни лица

Проучване	Брой	Материал	Метод	Единици	РГ	РГ-възраст	РГ-пол (м/ж)
Makris K, 2015	200	spot урина	PETIA BioPorto	ng/mL	< 54.5	не ¹	не
Schinstock C, 2013	125	диурезна урина	ELISA BioPorto	ng/mL	не	не	< 23.4/<65.0
Христова Ж, 2015	80	сутрешна урина	ELISA BioPorto	ng/mL	< 65.0	не	< 23.86/<73.04
Cullen MR, 2012	174	spot- урина	CLIA Abbott	μ g/l	< 107.0	19-40 г. < 91 40-59 г. < 59 60-88 г. < 250	< 91.0 / < 129
Pennemans V, 2013	338 (0-95г.)	spot- урина	ELISA Biovend.	μ g/l	не	21-30 г.: <73.88/149.29 31-40 г.: <87.54/153.60 41-50 г.: <103.95/158.37 51-60 г.: <123.70/163.62 61-70 г.: <146.52/169.38 71-80 г.: <176.31/175.68 >81 г.: <211.16/182.58	
Настоящото проучване	85	сутрешна урина	PETIA BioPorto	ng/mL	< 52.37	не	не

¹ установена е сигнификантна положителна корелация между uNGAL и възрастта
РГ – референтни граници

Таблица 22. Референтни граници за UNC при възрастни лица

Проучване	Брой	Материал	Метод uNGAL	Метод uCreat	Единици	РГ	РГ-възраст	РГ-пол (м/ж)
Schinstock C, 2013	125	диурезна урина	ELISA BioPorto	*	ng/mg	не	не	≤27.2/ ≤89.9
Христова Ж, 2015	80	сутрешна урина	ELISA BioPorto	ензимен	ng/mg	не	не	<20.72/<42.8
Cullen MR, 2012	174	spot-урина	CLIA Abbott	Jaffe-кинетичен	μg/mmol	< 13	19-40 г. <12 40-59 г. <8 60-88 г. <23	< 9/ <21
Pennemans V, 2013	338 (0–95 г.)	spot-урина	ELISA Biovend.	Jaffe-кинетичен	μg/g	не	21-30 г.: <125.5/243.2 31-40 г.: <122.1/236.5 41-50 г.: <127.6/247.0 51-60 г.: <142.9/276.6 61-70 г.: <171.4/332.2 71-80 г.: <221.0/428.9 >81 г.: <307.8/598.3	
Настоящото проучване	85	сутрешна урина	PETIA BioPorto	Jaffe-кинетичен	μg/mmol	не	не	< 3.36/ <6.34

РГ – референтни граници

В настоящото проучване не се констатира статистически значима разлика в концентрацията на uNGAL между двата пола, каквато се цитира в повечето литературни източници. Това би могло да се обясни с влиянието на осмоларитета на урината върху абсолютните стойности на uNGAL при изследването му в единична порция урина. След нормализиране на резултатите за uNGAL към тези на креатинин в урина, разликата в стойностите на UNC между мъже и жени достигна сигнификантна значимост, каквато се описва в литературата. Тази полова зависимост в стойностите на UNC най-вероятно се дължи на влиянието на няколко фактора, които се потенцират. Експерименти при мишки доказват, че естрогените стимулират експресията на NGAL в редица органи, като млечна жлеза и матка. Възможно е естроген-медирана експресия на NGAL в бъбречните тубули да обясни разликата в стойностите на uNGAL между мъже и жени, цитирана в някои проучвания. Друго възможно обяснение за по-високите резултати на UNC при жени са очакваните по-ниски концентрации на креатинин в урина, в резултат на по-малката мускулна маса. В нашето проучване се констатира сигнификантна разлика в стойностите на креатинин в урина между двата пола, с по-високи резултати при мъже, с което може да се обясни половата зависимост в стойностите на UNC.

При 5-ма от насочените лица в проучването е установена сигнификантна левкоцитурия и са изключени от обработката на данните. Средната стойност на uNGAL измерена при тях е 141.7 ng/mL и на UNC – 23.32 μg/mmol, тези резултати са значимо по-високи от определените референтни граници. NGAL е острофазов протеин, чиято концентрация в урината се повишава в хода на инфекции на пикочните пътища, което се дължи на освобождаването му от активираните неутрофили и експресията му от увредените тубуларни клетки.

2.2. Референтни граници на NGAL при деца. Биологична вариация

Референтните граници на NGAL при деца са определени в кохорта от 42 здрави лица на възраст от 6 – 17 г., чрез имунотурбидиметричен анализ. Биологичният материал, който е използван за анализ при определяне на pNGAL, е хепаринова плазма и при определяне на uNGAL е първа сутрешна урина. Изведените референтни граници при деца са: за pNGAL < 96.88 ng/mL, за uNGAL < 47.30 ng/mL и за UNC < 3.48 µg/mmol. При обработката на данните не се установи сигнификантна разлика по пол или възраст и за трите показателя.

Проучванията, които определят референтните граници на NGAL при деца, са малко, като по-голяма част от посочените в литературата очаквани стойности при здрави деца са изведени в клинични изпитвания с контролни групи, оценяващи ролята на маркера при бъбречно увреждане. Van Donge T et al. (2020) измерват нивата на pNGAL в EDTA плазма чрез PETIA сред 142 здрави деца на възраст 0 – 15г. Авторите определят референтни граници за pNGAL съответстващи на 5-ия и 95-ия перцентил, при деца – 1.4 – 78.6 µg/L, не установяват значима разлика в стойностите на pNGAL между отделните възрастови групи, както и между момичета и момчета. В проучването на Papadopoulou-Marketou et al. (2017) дефинираната контролна група от 49 деца на възраст от 3 – 18 г. имат стойности на pNGAL между 5.1 – 81.4 ng/mL (mean – 24.69±15.89 ng/mL), измерени чрез ELISA метод (Табл. 23).

Таблица 23. Референтни граници за pNGAL при деца

Проучване	Брой	Възраст	Материал	Метод	Единици	РГ
Van Donge T, 2020	142	0 – 15	EDTA-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	1.4 – 78.6
Papadopoulou M, 2017	49	3 – 18	плазма	ELISA BioPorto	ng/mL	5.1 – 81.4
Боцова В, 2018	15	7.8 ± 1.8	*	ELISA	ng/mL	154.9 ± 35.4
Настоящото проучване	42	5 – 17г	heparin-плазма	PETIA BioPorto	ng/mL	< 96.88

РГ – референтни граници

Bennett MR et al. (2015), измерват нивата на uNGAL в случайна порция урина, в кохорта от 368 здрави деца на възраст 3 – 18 години, чрез ELISA и определят като горна референтна граница на uNGAL при деца 57.6 ng/mL. Проучването докладва полово зависими стойности за отделните възрастови групи, каквито рапортуват и Pennemans V et al. (2013). Rybi-Szumińska et al. (2013) измерват нивата на uNGAL чрез ELISA в първа сутрешна урина при 172 деца и извеждат референтни граници за UNC както следва: 0.2 – 5.9 г. – 33.91 ng/mg, 6 – 9.9 г. – 26.23 ng/mg, 10 – 13.9 г. – 20.29 ng/mg и 14 – 17.9 г. – 15.69 ng/mg (Табл. 24, 25).

Таблица 24. Референтни граници за uNGAL при деца

Проучване	Брой	Възраст	Материал	Метод	Единици	РГ – обща група (момчета/момичета)
Bennett MR, 2015	368	3 – 18 г.	spot урина	ELISA BioPorto	ng/mL	3–18 г.< 57.6 (28.3/73.1) 3–5 г.< 39.1 (26.1/52.2) 5–10 г.< 58.5 (10.9/139.5) 10–15 г.< 66.8 (25.5/72.3) 15–18 г.< 74.7 (50.0/138.6)
Cangemi G, 2013	308	0.63–248 месеца	spot урина	CLIA Architect	ng/mL	< 58.7
Peppemans V, 2013	338 (0-95г.)	0 – 20 г.	spot- урина	ELISA Biovend	µg/l	0 – 10 г. < (52.97/141.80) 10 – 20 г. < (62.50/145.43)
Боцова В, 2018	15	7.8 ± 1.8	*	ELISA	ng/mL	53.31 ± 51.0
Настоящото проучване	42	5 – 17 г.	сутрешна урина	PETIA BioPorto	ng/mL	< 47.30

Таблица 25. Референтни граници за UNC при деца

Проучване	Брой	Възраст	Материал	Метод NGAL	Метод uCreat.	Единици	РГ – обща група (момчета/момичета)
Rybi-Szumińska, 2013	172	0 – 18 г.	сутрешна урина	ELISA R&D Systems	*	ng/mg	0.2–5.9 г. < 33.91 6.0–9.9 г. < 26.23 10–13.9 г. < 20.29 14–17.9 г. < 15.69
Cangemi G, 2013	308	0.63– 248 месеца	spot урина	CLIA Architect	*	ng/mg	UNC < 68.2
Peppemans V, 2013	338 (0-95г.)	0 – 20 г.	spot урина	ELISA Biovend	Jaffe-кинетичен	µg/g	0–10 г. < (167.3/325.4) 10-20 г.< (139.0/269.9)
Стойнова Л, 2018	30 (13 деца)	23.6 ± 12.8	сутрешна урина	ELISA	Jaffe-кинетичен	ng/mol	< 0.190
Настоящото проучване	42	5-12 г.	сутрешна урина	PETIA BioPorto	Jaffe-кинетичен	µg/mmol	< 3.48

Резултатите, получени в нашето проучване, са близки до тези посочени в литературата, но не и идентични, което би могло да се обясни с големината и характеристиките на подбраната кохорта деца и използвания метод за анализ. Не се установи полова или възрастова статистически значима разлика в стойностите на pNGAL, uNGAL или UNC, каквато се цитира в част от проучванията. Възрастовата зависимост в стойностите на UNC може да се обясни с промените в мускулната маса характерни с напредване на възрастта, които се асоциират с високи стойности на серумния и уринния креатинин. В нашето проучване се установи отрицателна корелация между UNC и възрастта, която не достигна статистически значима разлика. Необходимо е включване на допълнителни лица в различни възрастови групи, за да се оценят физиологичните възрастово обусловени промените на UNC при деца и при необходимост да се изведат референтни граници, диференцирани според годините.

Определените от нас възрастово и полово диференцирани референтни стойности на NGAL за българската популация, измерени чрез имунотурбидиметричен анализ са обобщени в таблица 26 (Табл. 26).

Таблица 26. Определените в настоящото проучване референтни граници на NGAL

Показател	Материал	Метод	Единици	РГ-мъже	РГ-жени	РГ-деца
UNC	1 ^{-ва} сутрешна урина	РЕТИА	µg/mmol	< 3.36	< 6.34	< 3.48
uNGAL	1 ^{-ва} сутрешна урина	РЕТИА	ng/mL	< 52.37		< 47.30
pNGAL	сер. плазма	РЕТИА	ng/mL	25 – 119.5		< 96.88

Данните в литературата показват, че е неприложимо сравнението на резултати от проучвания, при които се използват различни методи и аналитични платформи. С оглед правилната интерпретация на стойностите на NGAL е необходимо използване на полово, възрастово и методологично изведени референтни граници. Прилагането на нормализирани стойности на uNGAL (UNC) се препоръчва пред абсолютната концентрация на маркера, при определянето му в единична порция, поради дневните колебания в осмоларитета на урината. При тълкуване на резултатите на UNC, следва да се отчита влиянието на физиологичните промени в стойностите на уринния креатинин, аналитичния метод използван при определяне на уринен креатинин и мерните единици в които е представено съотношението. Оценката на стойностите на uNGAL и UNC трябва да се съобрази с резултатите от уринния седимент, като се отчита влиянието на левкоцитурията и ИПП в върху маркера и съотношението.

3. Диагностична надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ

ДБЗ е хронично усложнение на захарния диабет, водещо до повишена сърдечно-съдова заболеваемост и смъртност и риск от развитие на терминална бъбречна недостатъчност (ТБН). Диабетната нефропатия е заболяване, засягащо преимуществено гломерула, но редица проучвания посочват предиктивната роля на тубулоинтерстициалните лезии в развитието и прогресията на диабетната нефропатия. NGAL е един от най-обещаващите тубуларни биомаркери в диагностиката на бъбречните заболявания. Данните в литературата посочват NGAL като маркер с добър диагностичен профил в диагностиката на ДБЗ. Стойностите на NGAL корелират с прогресията на албуминовата екскреция, със спада на скоростта на гломерулна филтрация, с тежестта на бъбречното увреждане и с риска от прогресия до ТБН. Въпреки това редица причини извън ДБЗ могат да индуцират повишена експресия на NGAL. Всичко това налага необходимостта от допълнителни изследвания, за да се изясни ролята на NGAL в диагностиката на ДБЗ.

3.1. NGAL като маркер за диагноза на ДБЗ при пациенти със ЗД II

Съгласно насоките на KDIGO 2020, възприетите в настоящото проучване критерии за диагноза на ДБЗ са ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 ml/min/1.73 m². За да оценим диагностичната надеждност на NGAL в диагностиката на ДБЗ при пациенти със ЗД II, в

коhortата са включени 92-ма пациенти със ЗД II, на възраст от 18 до 89 г., от които 55% са жени и 45% са мъже. pNGAL е измерен в хепаринова плазма, а uNGAL в първа сутрешна урина, като резултатите за UNC са представени в $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Пациентите са разпределени по групи в зависимост от стойностите на ACR, eGFR, HbA1c и от наличието на ДБЗ. Формулата, която е използвана за изчисление на eGFR при пациенти със ЗД II, е СКД-EPI.

Статистическата обработка на данните показва, че стойностите на pNGAL, uNGAL и UNC, в цялата кохорта пациенти със ЗД II, са сигнификантно по-високи в сравнение с контролната група възрастни лица. В таблица 27 са обобщени медианите на pNGAL, uNGAL и UNC в контролната група и отделните подгрупи пациенти със ЗД II, разделени спрямо стойностите на ACR, eGFR и в зависимост от наличието на ДБЗ (Табл. 27).

Таблица 27. Определените в настоящото проучване медиани на NGAL в кохортата - ЗД II

Категория	Критерий	N (%)	pNGAL(ng/mL) median (IQR)	uNGAL(ng/mL) median (IQR)	UNC ($\mu\text{g}/\text{mmol}$) median (IQR)
контролна група	клинично здрави	85	72.65 (33.38) ^{4,6,8}	14.50 (11.55) ^{3,4,5,6,8}	1.75 (1.25) ^{2,3,4,5,6,7,8}
ЗД II група	ЗД II	92	79.10 (64.98) ¹	32.30 (67.15) ¹	4.78 (9.05) ¹
A1	ACR < 3 g/mol	41 (46%)	71.10 (53.00)	19.75 (24.80) ^{3,4}	2.52 (2.49) ^{1,3,4}
A2	ACR – 3 – 30 g/mol	28 (31%)	82.10 (50.87)	41.25 (61.85) ^{1,2}	7.86 (12.35) ^{1,2}
A3	ACR < 30 g/mol	21(23%)	121.70 (104.55) ¹	91.30 (100.70) ^{1,2}	10.94 (25.63) ^{1,2}
≤G2	eGFR ≥ 60 ml/min/1.73 m ²	63(68%)	69.80 (41.00) ⁶	28.45 (32.92) ¹	4.39 (10.51) ¹
≥G3	eGFR < 60 ml/min/1.73 m ²	29(32%)	121.90 (96.60) ^{1,5}	44.20 (57.06) ¹	6.21 (6.47) ¹
ЗД II без ДБЗ	ACR < 3 g/mol и eGFR ≥ 60 ml/min/1.73 m ²	36 (39%)	70.45 (40.38)	18.70 (21.90) ⁸	2.26 (2.27) ^{1,8}
ЗД II с ДБЗ	ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 ml/min/1.73 m ²	56 (61%)	93.55 (78.38) ¹	49.80 (77.40) ^{1,7}	8.54 (15.25) ^{1,7}

¹сигнификантна разлика със контролната група, ²сигнификантна разлика с A1, ³сигнификантна разлика с A2, ⁴сигнификантна разлика с A3, ⁵сигнификантна разлика с ≤ G2, ⁶сигнификантна разлика с ≥ G3, ⁷сигнификантна разлика със ЗД без ДБЗ, ⁸сигнификантна разлика със ЗД с ДБЗ

В настоящото проучване pNGAL се очерта като маркер за оценка на гломерулната филтрация, като пациентите със ЗД II с понижена гломерулна филтрация, дефинирана като eGFR < 60 ml/min/1.73 m², имат статистически значимо по-високи резултати за pNGAL, както спрямо контролната група, така и спрямо пациентите със ЗД II със запазена гломерулна филтрация. ROC анализът демонстрира добра диагностична ефективност на pNGAL в отиференциране на пациенти със ЗД II с eGFR < 60 ml/min/1.73 m² с AUC-ROC – 0.753. При cut-off – 121.65 ng/mL маркерът има диагностична ефективност 82% в разграничаване на

пациентите със ЗД II с понижена гломерулна филтрация. Установи се сигнификантна корелация на pNGAL с маркерите за оценка на гломерулната филтрация – положителна с концентрацията на урея и креатинин в плазма и отрицателна с eGFR.

По-голяма част от проучванията, които се срещат в литературата, оценяват ролята на pNGAL като маркер за ДБЗ при пациенти с нормална гломерулна филтрация. Volignano D et al. (2009) установяват положителна корелация между pNGAL и серумния креатинин и отрицателна с GFR в кохорта от 59 пациенти със ЗД II с $GFR > 30 \text{ ml/min}$ ($p < 0.05$ и $p < 0.01$). Kaul A et al. (2018) констатира отрицателна корелация между pNGAL и eGFR в група от 144 пациенти със ЗД II с $eGFR > 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. Żyłka A et al (2018) оценяват предиктивна стойност на гломерулни и тубуларни маркери като индикатори за ранно бъбречно увреждане при 80 пациента със ЗД II с медиана на $eGFR=92.4 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. Проучването проследява ретроспективно промените в eGFR и връзката им с изследваните биомаркери, те установяват понижение на гломерулната филтрация при 17 пациенти. Авторите посочват, че стойност на pNGAL над $61 \mu\text{g/L}$ е значимо свързана с понижение на eGFR.

GFR е лабораторен маркер, оценяващ бъбречната функция, и критерий за класификация на ХБЗ. „Златен стандарт“ в определянето на GFR е измерване клирънса на екзогенната субстанция инулин. Този метод е инвазивен, трудоемък и не се прилага в рутинната практика. Към момента най-често за оценка GFR при възрастни лица се използват формули като MDRD и СКD-EPI, базирани на концентрация на серумен креатинин, определен с метод, проследим до ID-MS (112). СКD-EPI демонстрира значително по-голяма точност от MDRD, при изчисление на eGFR в подгрупата с $GFR > 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. Следователно СКD-EPI е предпочитана при пациенти със ЗД, тъй като най-ранната хемодинамична аномалия е гломерулната хиперфилтрация с повишение на $GFR > 120 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. Ето защо в настоящото проучване бе приложена формулата СКD-EPI при изчисление на eGFR.

Наблюдаваната от нас и в част от проучванията връзка между гломерулната филтрация и концентрацията на pNGAL може да се обясни с бъбречната екскреция на протеина, като всяко понижение на гломерулната филтрация намалява клирънса на NGAL с последващата му акумулация в системната циркулация. Характерните морфологични промени при ДН включват задебеляване на гломерулната базална мембрана, мезангиална експанзия, хиализиране на аферентната и еферентната артериола, редуциране на числената плътност на подоцитите, нодуларна или дифузна гломерулосклероза и др. Тези структурни промени водят до последващата функционална недостатъчност, нарушена екскреторна функция на бъбрека и понижение на гломерулната филтрация.

В настоящото проучване не се установи корелация между pNGAL и ACR, статистически значимо по-високи резултати спрямо контролната група имат единствено пациентите в АЗ,

което е в съответствие с очакваното по-тежко бъбречно увреждане и по-силно намалената гломерулна филтрация. Редица проучвания посочват клиничната приложимост на pNGAL в диагностиката на патологична албуминурия и на бъбречно увреждане при пациенти със ЗД II. Volignano D et al. (2009) установяват сигнификатно по-високи резултати за pNGAL при пациентите със ЗД II с нормална албуминова екскреция в сравнение с контроли (52.5 vs 233.6 ng/mL), но не констатира значима корелация между pNGAL и ACR. Mahfouz MH et al. (2016) докладват по-високи стойности на pNGAL при пациентите със ЗД II с умерено и силно повишен ACR спрямо референтната група (97.8, 131 vs 46.5 ng/mL) и посочват положителна корелация на показателят с ACR ($r = 0.582$, $p = 0.0001$). Мета анализ, оценяващ ролята на pNGAL в диагностиката на ДБЗ, установява обединена чувствителност и специфичност 79% и 87%, обединено отношение на положителна и отрицателна вероятност 5.97 и 0.24. Анализът обобщава, че pNGAL е подходящ маркер за потвърждаване на ДБЗ.

Срещаните в литературата средни и cut-off стойности на NGAL за ДБЗ се различават значимо помежду си, което може да се обясни с хетерогенните условия за анализ. Това потвърждава тезата, че е неприложимо сравнение на резултати за NGAL между различни проучвания и посочва необходимостта от стандартизиране на анализа (Табл. 28).

Таблица 28. Средни стойности/медиани на pNGAL при пациенти със ЗД II

Проучване	КГ	A1	A2	A3	Единици	+ ACR $p < 0.05$	- GFR $p < 0.05$	Метод
Bolignano D, 2009	52.5	233.6 ³	290.4 ³	890.9	ng/mL	Не	Да	ELISA Gentofte
Mahfouz MH, 2016	46.4 ¹	55.6 ¹	97.8	131.0	ng/mL	Да	Да	ELISA R&D
Motawi TK, 2017	45.5 ¹	55.7 ¹	97.9		ng/mL	Не	Не	ELISA R&D
Wu C, 2014	59.0	138.1	245.2 ⁴	255.5 ⁴	ng/mL	Да	-	ELISA EIAab&U
Siddiqi Z, 2017		126.7	155.1		ng/mL	Да	-	ELISA R&D
Żyłka A, 2018		53.8	67.2		µg/L	Не	Не	ELISA BioVendor
Kaul A, 2018	42.6	113.6	263.2	474.9	ng/mL	Да	Да	ELISA R&D
Forghani MS, 2020		70.0	99.8		ng/mL	Да	Не	ELISA Biotech.
Настоящото проучване	72.6 ¹	71.1 ^{1,3}	82.1 ^{2,3}	121.7	ng/mL	Не	Да	PETIA Bioporto

¹ липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$), ² липсва сигнификантна разлика между A2 и контролна група ($p > 0.05$), ³ липсва сигнификантна разлика между A2 и A1 ($p > 0.05$), ⁴ липсва сигнификантна разлика между A3 и A2 ($p > 0.05$)

Съкращения: КГ – контролна група; +ACR – сигнификантна положителна корелация с AER/ACR ($p < 0.05$); -GFR – сигнификантна отрицателна корелация с GFR ($p < 0.05$).

В естествения ход на бъбречното увреждане при ЗД, понижението на eGFR е най-често късен индикатор за наличие на ДБЗ. Следователно биомаркери, които корелират само с понижението на eGFR, но не и с албуминурията, не са подходящи за диагностика на ДБЗ. Тази

констатация може да обясни и получените от нас резултати и извода, че самостоятелното използване на pNGAL няма необходимата ефективност за рутинна диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД II.

В настоящото проучване се установи, че в кохортата пациенти със ЗД II стойностите на uNGAL и UNC корелират сигнификантно с промените в албуминовата екскреция, като UNC показва по-добра зависимост с ACR от uNGAL. Стойностите на uNGAL и UNC нарастват прогресивно от A1 до A3, като сигнификантна разлика се констатира между A1 vs A2 и между A1 vs A3. Пациентите със ЗД II с умерено и силно повишен ACR имат статистически значимо по-високи резултати за uNGAL и UNC от контролната група, като пациентите с нормоалбуминурия имат и сигнификантно по-високи резултати за UNC. Очерта се полова разлика в стойностите на UNC в отделните подгрупи пациенти, разделени спрямо ACR и eGFR. Жените имат по-високи резултати за UNC от мъжете във всяка една от подгрупите, като разликата е сигнификантно значима само в подгрупа A1 и в подгрупата с eGFR ≥ 60 ml/min/1.73 m² и намалява с прогресията на бъбречното увреждане. Ето защо са изведени полого зависими cut-off стойности на UNC за бъбречно увреждане.

ROC анализът демонстрира добра диагностична ефективност на uNGAL в отдиференциране на пациенти със ЗД II с повишен ACR (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.776. Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 53.30 ng/mL успява правилно да идентифицира пациент със ЗД II с ACR > 3.0 g/mol е 67 %. Съотношението UNC показва много добра диагностична точност в разграничаване на пациентите със ЗД II с албуминурия (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC при жени – 0.845 и при мъже – 0.904. При cut-off стойност при жени – 6.87 μ g/mmol и при мъже – 3.72 μ g/mmol диагностичната ефективност на маркера е съответно 80% и 92% в откриване на пациентите със ЗД II с ACR > 3.0 g/mol.

Стойностите на uNGAL и UNC са сигнификантно по-високи при пациентите със ЗД II с ДБЗ (дефинирано като ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60 ml/min/1.73 m²), в сравнение с пациентите със ЗД II без ДБЗ и контролната група. Пациентите със ЗД II без ДБЗ имат и статически значимо по-високи резултати за UNC от референтната група.

ROC анализът демонстрира добра диагностична надеждност на uNGAL (AUC-ROC – 0.787) и UNC (AUC-ROC при жени – 0.845 и при мъже – 0.904) в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II (ЗД без ДБЗ vs ЗД с ДБЗ). Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 53.30 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти със ЗД II с ДБЗ, е 65 %. При cut-off стойност на UNC при жени – 6.87 μ g/mmol и при мъже – 3.72 μ g/mmol маркерът има диагностичната ефективност 69% и 89% в разграничаване на пациентите със ЗД II с ДБЗ. UNC има по-добра диагностична точност от uNGAL в диагностициране на пациенти с ДБЗ, самостоятелното използване на маркера

статистически значимо различава пациентите със ЗД II с бъбречно увреждане. Увеличението на UNC с 1 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ при пациентите със ЗД II повишава вероятността за ДБЗ при жени 1.16 пъти, а при мъже 2.40 пъти.

По-голяма част от проучванията при пациенти със ЗД II, които се срещат в литературата, дефинират ДБЗ, като повишение на AER/ACR. Bolignano D et al. (2009) установяват при пациенти със ЗД II, позитивна корелация между uNGAL с ACR ($p < 0.01$) и негативна корелация с GFR ($p < 0.005$), сигнификантна разлика в стойностите на uNGAL между пациентските групи, разделени спрямо ACR и значимо по-високи резултати спрямо контролната група (6.5 vs 51.1 vs 105.9 vs 255.6 ng/mL). Żyłka A et al. (2018) изследват ролята на гломерулни и тубуларни маркери в диагностиката на ДБЗ при пациенти със ЗД II и констатира значима корелация между ACR с uNGAL ($p < 0.001$) и с UNC ($p = 0.002$), както и сигнификантно по-високи стойности на uNGAL и UNC в групата с ACR $> 30 \text{ mg}/\text{g}$ в сравнение с кохортата с ACR $< 30 \text{ mg}/\text{g}$ (24.7 vs 10.3 $\mu\text{g}/\text{L}$, 35.1 vs 9.02 $\mu\text{g}/\text{g}$). Данните и от други проучвания потвърждават клиничната приложимост на uNGAL и UNC в диагностиката на бъбречното увреждане сред пациенти със ЗД II. Литературните източници посочват, че резултатите на uNGAL и UNC корелират с прогресията на албуминовата екскреция, със спада на eGFR и с тежестта на ДБЗ при пациенти със ЗД II (Табл. 29, 30).

Таблица 29. Средни стойности/медиани на uNGAL при ЗД II

Проучване	Показател	КГ	A1	A2	A3	Единици	+ ACR $p < 0.05$	- GFR $p < 0.05$	Метод
Bolignano D, 2009	uNGAL	6.5	51.1	105.9	255.6	ng/mL	Да	Да	ELISA Gentofte
Siddiqi Z, 2017	uNGAL		4.8	10.3		ng/mL	Да	-	ELISA R&D
Żyłka A, 2018	uNGAL		10.3	24.7		$\mu\text{g}/\text{L}$	Да	Не	CLIA Abbott
Assal HS, 2013	uNGAL	4.3	7.4	10.1	17.4	ng/mL	Да	-	ELISA BioVendor
Sueud T, 2019	uNGAL	40.5	58.7	64.0	72.8	ng/mL	Не	-	ELISA Elabscience
Abbasi F, 2020	uNGAL	77.0	114.1	122.1 ³	129.1 ³	ng/mg	-	Да	ELISA BioassayT.
Vijay S, 2018	uNGAL	26.6	146.1	228.2		ng/mL	Да	-	ELISA -
Kaul A, 2018	uNGAL	7.9	31.3	110.3	352.9	ng/mL	Да	Да	ELISA R&D
Forghani MS 2020	uNGAL		70.0	99.8		ng/mL	Да	Не	ELISA Biotech.
Настоящо проучване	uNGAL	14.5 ¹	19.7 ¹	41.2 ³	91.3 ³	ng/mL	Да	Да	PETIA Bioporto

¹ липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$)

³ липсва сигнификантна разлика между A3 и A2 ($p > 0.05$)

Съкращения: КГ – контролна група; +ACR – сигнификантна положителна корелация с AER/ACR ($p < 0.05$); -GFR – сигнификантна отрицателна корелация с GFR ($p < 0.05$).

Таблица 30. Средни стойности/медиани на UNC при ЗД II

Проучване	Показател	КГ	A1	A2	A3	Единици	+ ACR p<0.05	- GFR p<0.05	Метод
Žyška A, 2018	UNC		9.02	35.1		µg/g	Да	Не	CLIA Abbott
Fu WJ, 2012	UNC	32.9	69.2	123.6	235.0	µg/g	Да	Да	ELISA R&D
Kaul A, 2018	UNC	7.0	31.3	98.2	273.2	ng/g	Да	Да	ELISA R&D
*Fufaa GD, 2014	UNC		5.39	6.92	9.81	ng/mmol	Да	Не	CLIA Abbott
*Настоящо проучване	UNC	1.75	2.52	7.86	10.94	µg/mmol	Да	Да	PETIA Bioporto

* установена е статистически значима разлика в стойностите на UNC между мъже и жени

Мета анализ, оценяващ ролята на uNGAL и UNC в диагностиката на ДБЗ, установява, че в дефернцирането на пациентите със ЗД II с патологична албуминурия uNGAL има обединена чувствителност и специфичност – 83% и 81% с AUC-ROC – 0.89, а UNC обединена чувствителност и специфичност – 42% и 73% с AUC-ROC – 0.69. Анализът констатира, че uNGAL и UNC са ценни биомаркер за диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД II, като диагностична им точност варира от умерена до висока според стойностите на AUC-ROC. Tang XY et al. (2019) обобщават данните за ролята на uNGAL в разграничаване на пациенти с ACR > 3 g/mol сред пациентите със ЗД II и посочва обединена чувствителност и специфичност - 82% и 81% с AUC-ROC-0.88 в проучванията с напречно и 96% и 89% с AUC-ROC-0.98 в кохортните проучвания. Авторите констатира, че натрупаните доказателства показват ефикасността на uNGAL като маркер за бъбречно увреждане при ЗД (Табл. 31).

Таблица 31. Диагностична ефективност на uNGAL и UNC в разграничаване на пациентите със ЗД II с ACR >3.0 g/mol.

Проучване	Показател	Cut-off	Единици	ДЧ	ДС	LR+	LR-	ППС	ОПС	ДЕ
Sueud T, 2019	uNGAL	21.4	ng/mL	94%	26%	1.28	0.20	50%	15%	16%
Žyška A, 2018	uNGAL	14.3	µg/L	80%	61%	2.05	0.32	39%	90%	65%
Kaul A, 2018	uNGAL	49.0	ng/mL	90%	83%	5.29	0.12	90%	83%	87%
Assal HS, 2013	uNGAL	8.8	ng/mL	67%	89%	6.09	0.37	89%	69%	77%
настоящо проучване	uNGAL	53.30	ng/mL	47%	90%	4.67	0.59	84%	60%	67%
Žyška A, 2018	UNC	28.3	µg/g	60%	87%	4.61	0.46			
Kaul A, 2018	UNC	50.0	ng/g	95%	89%	8.63	0.06	93%	91%	93%
Fufaa GD, 2014	UNC	8.0	ng/mmol	25%	81%	1.32	0.92	41%	67%	62%
настоящо проучване	UNC-жени	6.87	µg/mmol	75%	86%	5.24	0.29	88%	72%	80%
настоящо проучване	UNC-мъже	3.72	µg/mmol	88%	95%	16.64	0.12	94%	90%	92%

ДЧ - диагностична чувствителност, ДС - диагностична специфичност, LR+ отношение на положителна вероятност, LR- отношение на отрицателна вероятност, ППС - положителната предсказваща стойност, ОПС - отрицателната предсказваща стойност, ДЕ – диагностична ефективност

Към момента AER/ACR е най-ранният лабораторен маркер за наличието на ДБЗ, критерий за класификация на ДБЗ и предиктор на кардиоваскуларните усложнения при ЗД. Наблюдаваната от нас и в част от проучванията връзка между uNGAL и UNC с AER/ACR при пациенти със ЗД II може да се дължи на общи и потенциращи се механизми при ДБЗ, които водят до патологична екскреция и на двата протеина. Албуминът е отрицателно зареден белтък с молекулна маса 69 kDa, който се появява в урината в патологична концентрация при загуба на „товарното сито“ на гломерулната филтрационна бариера и е най-добрият маркер за селективната гломерулна протеинурия. Развитието на ДН води до увреждане на гломерулната филтрационна бариера, включваща капилярен ендотел, гломерулна базална мембрана и подоцити, което е причина за повишена екскреция на албумин. Но все повече данни сочат, че в развитието на патологична албуминурия роля има и тубуларното увреждане, което ограничава реабсорбция му от многолигандния рецептор мегалин/кубилин. Проучвания върху животни показват, че в ранните стадии на ДБЗ реабсорбция на албумин намалява, без да се увеличава гломерулната му филтрация, което може да се обясни с намалена албуминова ендоцитоза или с намалена експресия на рецептора мегалин/кубилин. Според „хипотеза за извличане“ гломерулите филтрират високи нива на албумин, който се появява в урината в патологично количество, само ако настъпи нарушение в тубулната реабсорбция. От друга страна патологичната "гломерулна" албуминурия може да превиши капацитета за реабсорбция на увредените тубуларни клетки. Персистиращата протеинурията е също причина за прогресивно увреждане на бъбречния паренхим, което може да ускори развитието на ДБЗ, като активира възпалителни пътища в проксималните епителни клетки и инициира тубулоинтерстициално възпаление и фиброза. Следователно патологичната албуминурия може да е и индикатор за тубуларно увреждане. NGAL е положително зареден белтък (pI > 7.4) с ниска молекулна маса (25 – 70 kDa), който свободно се филтрира през гломерула, но се реабсорбира в проксималните бъбречни каналчета, чрез мегалин/кубилин-зависима ендоцитоза. Чрез *in situ* хибридизация е доказано, че в отговор на тубуларно увреждане настъпва интензивна експресия на NGAL иРНК от бримката на Хенле и събирателните каналчета. Следователно повишена екскрецията на NGAL може да настъпи при ренална увреда, която засяга реабсорбцията му в проксималния тубул и/или индуцира неговия синтез *de novo* в дисталния тубул. Това обяснява защо NGAL е определян като тубуларен маркер. Белтъците NGAL и албумин имат общ механизъм на реабсорбция в проксималните тубули и при всяко увреждане на бъбречните каналчета може да се очаква увеличена екскрецията и на двата протеина. Едновременно с това, патоморфологичните промени при ДН засягат както гломерула така и тубулоинтерстициума на бъбрека, като абнормната протеинурия играе също важна роля в патогенезата на тубуларното увреждане, следователно при ДБЗ може да се

очаква повишение както на гломерулни (албумин), така и за тубуларни биомаркери (албумин и NGAL).

В нашето проучване се констатира, че пациенти със ЗД II с $ACR < 3$ g/mol и пациенти без бъбречно увреждане имат по-високи резултати за UNC в сравнение с контролната група възрастни лица. Резултатите от редица проучвания демонстрират значимо по-висока концентрация на NGAL в плазма и урина при пациенти със ЗД с нормална скорост на албуминова екскреция в сравнение с контролна група. Kaul A et al. (2018) изследват нивата на UNC при пациенти със ЗД II и установяват значима разлика в стойностите на показателя, както между отделните стадии на ДБЗ, така и между пациентите със ЗД II с нормален ACR и контроли. Те определят cut-off стойност на UNC 24.96 ng/mg в идентифицирането на ДБЗ с нормален ACR с AUC-ROC – 0.996. Авторите описват NGAL като маркер за тубулоинтерстициално увреждане, който може да установи развитието на ДБЗ преди неговото диагностициране с повишената AER, и определят NGAL като полезен и неинвазивен показател за диагностика на ДБЗ.

Повишената AER често е първият клиничен индикатор за наличието на ДБЗ, но не винаги е маркер за бъбречната дисфункция при диабет. ДБЗ е възможно да се развие и при пациенти с нормална AER, при които е налице не-албуминуричен фенотип на бъбречното увреждане. Както и не всички пациенти с патологична албуминурия развиват прогресивна бъбречна дисфункция. Хистологични промени в тубулоинтерстициума, които могат да се наблюдават при ДН, са тубуло-епителна клетъчна хипертрофия, задебеляване на тубуларната базалната мембрана, епително-мезенхимен преход, натрупване на гликоген, тубулоинтерстициална фиброза и тубулна атрофия. Някои от тези промени се развиват първично и не са индуцирани от гломерулната патология. Duan S et al. (2021) посочват и акцентират върху ролята на структурни и функционални промени в бъбречните тубули, които могат да инициират и да стимулират бъбречната дисфункция при ЗД и обобщават, че са натрупаните доказателства за промяна в традиционната парадигма за развитието на ДН – от гломерулоцентрична към тубулоцентрична. Според хипотезата за „тубуларна фаза“ на ДБЗ тубулното увреждане е първично нарушение инициращо развитието на бъбречна дисфункция при пациенти със ЗД, следователно структурен тубуларен маркер като NGAL може да бъде по-ранен лабораторен признак за ДБЗ от AER.

Патогенезата на ДН е сложна и многофакторна, в развитието ѝ участват хемодинамични и метаболитни фактори индуцирани от хипергликемията и/или инсулиновия дефицит като хипоксия, оксидативен стрес, активиране на редица възпалителни и апоптотични пътища и др.. Множеството структурни и функционалните промени могат да се появят едновременно и да прогресират с различна скорост в диабетния бъбрек, което води до висока хетерогенност

на заболяването. Въпреки че точната хронологична последователност от събития не е добре дефинирана, то причина за клиничните прояви на ДБЗ са както патогномоничните морфологични промени в гломерула (гломерулосклероза), така и тубулоинтерстициални увреждания. С оглед на това за ранната диагностика на ДБЗ са необходими биомаркери с висока специфичност към различни аспекти на бъбречното увреждане при ЗД II.

В естественият ход на бъбречното увреждане при ЗД II, повишението на ACR най-често е първият клиничен индикатор за наличие на ДБЗ. Следователно биомаркери, които корелират с албуминурията, са подходящи за откриване на ДБЗ. Тази констатация може да обясни и получените от нас резултати, че uNGAL и UNC имат необходимата диагностична надеждност в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II (ЗД без ДБЗ vs ЗД с ДБЗ). UNC показва по-добра диагностична ефективност от uNGAL в диагностициране на пациенти с ДБЗ, самостоятелното използване на маркера статистически значимо различава пациентите със ЗД II с бъбречно увреждане (Табл. 32).

Таблица 32. Определените в настоящото проучване cut-off стойности за ДБЗ – ACR > 3 g/mol и/или eGFR < 60ml/min/1.73 m²

Показател	Cut-off	Единици	ДЧ	ДС	LR+	LR-	ППС	ОПС	ДЕ
uNGAL	53.3	ng/mL	45%	94%	7.64	0.58	92%	53%	65%
UNC - жени	6.87	µg/mmol	64%	81%	3.38	0.44	88%	52%	69%
UNC - мъже	3.72	µg/mmol	83%	94%	14.88	0.18	94%	85%	89%

Констатираната от нас полова зависимост в резултатите на UNC се цитира и от Fufaa GD et al. (2014). Те установяват медиана при жени 9.4 ng/mmol и при мъже 1.8 ng/mmol сред пациенти със ЗД II. Тази полова диференциация в стойностите на UNC е възможно да се дължи на естроген-медирана експресия на NGAL в бъбречните тубули и/или на очакваните по-ниски концентрации на креатинин в урина при жени, в резултат на по-малката мускулна маса. В нашето проучване кохортата мъже има по-високи резултати за креатинин в урина от кохортата жени със ЗД II, с което може да се обяснят и по-високи резултати за UNC при жени в сравнение с мъже при пациентите със ЗД II. Но разликата между двата пола се оказва сигнификантна само при пациентите със ЗД II с нормална бъбречна функция и намалява паралелно с прогресията на бъбречното увреждане. С развитието и напредването на ДБЗ тубуларното увреждане, което причинява намалена реабсорбция или повишена експресия на NGAL, става определящ фактор за концентрацията му в урина и за получените стойности на UNC. Всичко това намалява значението на половите различия в концентрацията на uNGAL и uCreatinine и влиянието им върху резултатите за UNC.

3.2. NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД II

Съгласно насоките на KDIGO 2020, пациентите със ЗД II са класифицирани според тежестта и прогнозата на ДБЗ спрямо стойностите на ACR и eGFR в 4 групи. В зависимост от гликемичния контрол са формирани две подгрупи пациенти. Тъй като лошият гликемичен контрол е основен фактор в развитието и прогресията на ДБЗ, е оценена връзката му с нивата на NGAL в плазма и урина. В Таблица 33 са представени медианите и интерквartilните обхвати на pNGAL, uNGAL и UNC в отделните подгрупи (Табл. 33)

Таблица 33. Определените в настоящото проучване медиани на NGAL в кохортата - ЗД II

Категория	N (% от групата)	pNGAL(ng/mL) median (IQR)	uNGAL(ng/mL) median (IQR)	UNC (µg/mmol) median (IQR)
ЗД II (цялата кохорта)	92	79.10 (64.98)	32.30 (67.15)	4.78 (9.05)
нисък риск	36 (39.1%)	70.45 (40.38)	18.70 (21.90) ^{2,3,4}	2.26 (2.27) ^{2,3,4}
умерен риск	20 (21.7%)	75.55 (41.05)	36.50 (37.95) ¹	7.85 (13.53) ¹
висок риск	21 (22.8%)	114.65 (103.18)	47.00 (86.93) ¹	6.21 (30.18) ¹
много висок риск	15 (16.3%)	121.80 (116.35)	99.80 (105.00) ¹	9.77 (10.87) ¹
добър контрол	20 (27%)	87.60 (106.38)	27.10 (30.70)	3.98 (8.32)
лош контрол	54 (73%)	73.80 (67.95)	32.40 (44.08)	4.86(11.45)

¹сигнификантна разлика с групата с нисък риск, ²сигнификантна разлика с групата с умерен риск, ³сигнификантна разлика с групата с висок риск, ⁴сигнификантна разлика с групата с много висок риск

Обработката на данните показва, че стойностите на pNGAL, uNGAL и UNC нарастват прогресивно със степента на бъбречното увреждане, но тази разлика достига сигнификантна значимост само при резултатите на uNGAL и UNC. Стойностите на uNGAL и UNC в групата с нисък риск се различават статистически значимо със съответните им резултати във всички останали групи, разделени спрямо тежестта и прогнозата на ДБЗ (умерен, висок и много висок риск). Не се констатира сигнификантна разлика в стойностите на pNGAL, uNGAL и UNC между групите с добър и лош гликемичен контрол.

Установи се статистически значима корелация между pNGAL и маркерите за оценка на гломерулната филтрация – позитивна с урея и креатинин и негативна с eGFR. uNGAL показва сигнификантна корелация с AER и ACR и отрицателна с eGFR. UNC корелира статистически значимо положително с AER, ACR и HbA1c и отрицателно с eGFR. Не се установи значима корелация и за трите маркера с показателите за оценка на метаболитния контрол.

Едновременното използване на двата маркера pNGAL и UNC демонстрира по-коректна оценка на прогнозата на ДБЗ, отколкото прилагането им самостоятелно, като и двата маркера са статистически значимо свързани с разпределението на пациентите по групи, спрямо

тежестта на ДБЗ. Моделът, използващ pNGAL и UNC, е способен статистически значимо да дискриминира групите с ДБЗ и успешно прогнозира разпределението на 57% от пациентите със ЗД II в съответните групи, спрямо степента на бъбречно увреждане и тяхната прогноза. При комбинираното приложение на двата маркера pNGAL и UNC успешно се прогнозира наличието на ДБЗ с висок и много висок риск сред пациентите със ЗД II. Повишението на pNGAL с 1 ng/mL увеличава шанса пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск с 1.01 пъти, а повишението на UNC с 1 µg/mmol увеличава вероятността пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск с 1.09 пъти (жени – 1.07 пъти, мъже – 1.14 пъти).

Данните в литературата посочват предиктивната роля на тубуло-интерстициалните лезии в прогресията на ДН. Okada T. et al. (2012) отбелязват, че интерстициалното възпаление и фиброза и тубулната атрофия при пациенти с ДН са основни фактори, свързани с бъбречната прогноза и развитието на ТБН. Mise K et al. (2015) доказват значението на IFTA-score за оценка на риска от прогресия на реналното увреждане при пациенти със ЗД. Hoshino J et al. (2018) разработват система за стратификация на риска при пациенти с ДН, основана на характерните патоморфологични промени, която включва както гломерулни, така и тубулоинтерстициални лезии. Това очертава ролята на тубуларни маркери като детерминанти за ранен спад на бъбречната функция при пациенти със ЗД. Редица клинични проучвания в различен модел оценяват ролята на NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ. Hwang S et al. (2017) изследват връзката между тъканната експресия на NGAL и KIM-1, както и хистопатологични и лабораторни параметри за бъбречната прогресия при пациенти с доказана ДН. Проучването установява, че IFTA-score положително корелира със спада на eGFR и констатира, че тубулоинтерстициалното увреждане е най-важната хистологична находка при прогресия на ДН. Те установяват, че тъканната експресия на NGAL и KIM-1 корелира отрицателно с eGFR, но само тъканната експресия на NGAL е независим предиктор за спад на eGFR. Satirapoj B et al. (2016) констатира, че пациентите със ЗД тип II с по-високи нива на uNGAL имат по-бърз спад в бъбречната функция, UNC > 772 ng/g прогнозира спад на eGFR > 25% годишно, с AUC-ROC – 0.64. Те подчертават решаващата роля, която играе тубуларното увреждане в прогресията на ДБЗ и развитието му до терминален стадий. Nowak N et al. (2018) оценяват изходните нива на гломерулни и тубуларни маркери, свързани с ранен спад на бъбречната функция, проследявайки голяма кохорта пациенти със ЗД II с нормален eGFR за период от 5 – 12 г. Те констатира, че UNC е сигнификантно по-висок в групата с бърз спад на бъбречната функция, дефинирана като понижение на eGFR > 30% за период от 5 години, в сравнение с пациентите с по-нисък спад на eGFR.

Редица проучвания оценяват и връзката между лошия контрол на ЗД и развитието на ДБЗ, с нивата на NGAL. Al-Refai et al. (2014) установяват в кохорта пациенти със ЗД II положителна

корелация между logUNC и HbA1c, регресионният анализ посочва HbA1c като независим предиктор на съотношението logUNC. Mahfouz MH et al. (2016) констатираат сигнификантна корелация между pNGAL с давността на диабета, систолното и диастолното кръвно налягане, HbA1c, HOMA-IR и триглицериди при пациенти със ЗД II.

В препоръките на KDIGO 2020, eGFR и AER или ACR са основни критерии за стратификация на ДБЗ. Следователно използването на един или няколко маркера, които корелират с промените и в двата показателя, ще постигне по-добра оценка на тежестта и прогнозата на ДБЗ. В съответствие на тази констатация са и резултатите от нашето проучване. Данните показват, че pNGAL корелира с понижението на гломерулната филтрация, а UNC с ACR, едновременното използване на резултатите за pNGAL и UNC сигнификантно прогнозира тежестта на ДБЗ, като pNGAL подобрява значимо прогностичната стойност на UNC в стратификацията на ДБЗ сред пациенти със ЗД II.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group посочват, че дългосрочната кумулативна гликемична експозиция е основен рисков фактор за развитието на ДБЗ. Повисоките нива на триглицериди и систолно кръвно налягане са също независими детерминанти за бъбречно увреждане при пациенти със ЗД. В съответствие с тези данни в нашето проучване се констатира сигнификантна корелация между UNC и HbA1c, най-вероятно израз на по-тежко бъбречно увреждане при пациенти с лош гликемичен контрол. В обследваната от нас кохорта не се установи значима корелация между pNGAL, uNGAL и UNC с лабораторните маркери оценяващи метаболитния контрол.

3.3. NGAL маркер за диагноза и прогноза на ДБЗ при пациенти със ЗД I

За да оценим диагностичната надеждност на NGAL като маркер за ДБЗ при пациенти със ЗД I, в кохортата са включени 75 деца на възраст от 6 до 17 г., с продължителност на ЗД I - 7.09 ± 2.59 г., от които 44% са момичета и 56% са момчета. pNGAL е измерен в хепаринова плазма, а uNGAL в първа сутрешна урина, като резултатите за UNC са представени в $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Пациентите са разпределени по групи в зависимост от стойностите на ACR, eGFR, HbA1c. В тази пациентска кохорта се констатира наличие на бъбречно увреждане при малък брой деца със ЗД I, което е в съответствие с относително малката давност на ЗД I.

eGFR при пациентите със ЗД I е изчислен с утвърдената формула Bedside Schwartz-GFR_(Bedside Schwartz) и алтернативната формула СКД-EPI40 - eGFR_(СКД-EPI40). Предпочетено е да се приложат и оценят и двете, тъй като формулата Bedside Schwartz е валидирана при деца с понижена гломерулна филтрация. Извършеният от нас регресионният анализ констатира много добра зависимост между двете използвани формули и липса на статистически значима разлика при сравнение на резултатите.

Статистическата обработка на данните показва, че в цялата пациентска кохорта ЗД I единствено резултатите на UNC са сигнификантно по-високи в сравнение с контролната група деца. В Таблица 34 са обобщени медианите на pNGAL, uNGAL и UNC в отделните подгрупи пациенти със ЗД I, разделени спрямо стойностите на ACR, eGFR и HbA1c (Табл. 34).

Таблица 34. Определените в настоящото проучване медиани на NGAL в кохортата - ЗД I

Категория	N (% от групата)	pNGAL(ng/mL) median (IQR)	uNGAL(ng/mL) median (IQR)	UNC (µg/mmol) median (IQR)
контролна група	42	66.15 (28.45)	13.70 (10.35)	1.47 (1.06)
ЗД I (цялата кохорта)	75	58.20 (33.40)	13.00 (15.00)	1.94 (2.14)
A1 (ACR < 3 g/mol)	53 (72%)	57.75 (27.85)	12.00 (7.57) ³	1.64 (1.56) ³
A2 (ACR – 3–30 g/mol)	19 (25%)	66.50 (88.78)	41.4 (66.10) ^{1,2}	8.49 (12.82) ^{1,2}
eGFR _(Bedside Schwartz) ≥90	15 (21%)	56.50 (27.95)	12.35 (17.25)	2.00 (2.22)
eGFR _(Bedside Schwartz) <90	55 (79%)	80.60 (80.00)	21.30 (15.93)	2.00 (7.20)
eGFR _(CKD-EPI40) ≥90	24 (32%)	53.95 (25.67) ⁴	14.28 (23.32)	2.37 (3.83)
eGFR _(CKD-EPI40) <90	50 (68%)	77.10 (57.70) ⁵	12.00 (10.95)	1.90 (1.29)
добър контрол	33 (45%)	59.00 (43.2)	12.00 (8.90)	1.71 (1.40) ⁷
лош контрол	41 (55%)	54.90 (35.6)	16.10 (27.90)	2.79 (6.70) ^{1,6}

¹сигнификантна разлика със контролната група, ²сигнификантна разлика с A1, ³сигнификантна разлика с A2, ⁴сигнификантна разлика с eGFR_(CKD-EPI40) < 90, ⁵сигнификантна разлика с eGFR_(CKD-EPI40) ≥90, ⁶сигнификантна разлика с добър гликемичен контрол, ⁷сигнификантна разлика с лош гликемичен контрол

В настоящото проучване се констатира отрицателна корелация между pNGAL с двете използвани формули за изчисление на eGFR, но тя се оказва сигнификантна само с eGFR_(CKD-EPI40). Установи се, че резултати за pNGAL са статически значимо по-ниски при пациентите със ЗД I с eGFR_(CKD-EPI40) ≥ 90 ml/min/1.73 m² спрямо тези с eGFR_(CKD-EPI40) < 90 ml/min/1.73 m², като стойностите на uNGAL и UNC между тези две групи са сравними. С оглед малкия брой пациенти с eGFR_(CKD-EPI40) ≥ 120 ml/min/1.73 m² не се формира група за оценка на гломерулната хиперфер филтрация, следователно не можем да оценим ролята на маркера в диагностиката на този ранен стадий на бъбречното увреждане при ЗД I. Допълнително смятаме, че анализът, използван в проучването, има незадоволителни аналитични характеристики при определяне на ниски стойности на NGAL, следователно е неприложим за оценка на гломерулна хиперфилтрация, тъй като и здравите деца имат стойности на pNGAL под измервателния диапазон на метода (LLOQ). Получените от нас резултати посочват възможната перспектива на маркера, но не и на анализа за оценка на стадия на гломерулна хиперфилтрация при пациенти със ЗД. В подкрепа на тази констатация са и данните от проучването на Fu WJ et al. (2012), които установяват сигнификантно по-ниски нива на pNGAL при пациенти със ЗД II с

гломерулна хиперфилтрация в сравнение с контроли (12.0 vs 21.7 ng/mL). Те обясняват получените резултати с хемодинамичните промени, които водят до по-висок клирънс на плазмения NGAL в този ранен стадий на бъбречно увреждане при ЗД. Sołtysiak J et al. (2014) констатира значима разлика в стойностите на циркулиращия NGAL между пациентите със ЗД I с eGFR >135 ml/min/1.73 m² както спрямо пациентите със запазена гломерулна филтрация, така и спрямо контролната група (111.3 vs 129.5 vs 151.3 ng/mL). Авторите подчертават значението на гломерулната хиперфилтрация върху концентрацията на pNGAL, но посочват необходимостта от допълнителни проучвания, за да се потвърдят получените резултати.

Най-ранната проява на ДБЗ при ЗД I е гломерулната хиперфилтрация, дължаща се на аферентна артериоларна вазодилация в резултат на индуцираните от хипергликемията вазоактивни медиатори, но важна роля има и тубуларното увреждане, което потенцира ефекта на тубуло-гломерулната обратна връзка. „Златен стандарт“ в определянето на GFR е измерване клирънса на екзогенната субстанция инулин, по време на непрекъсната интравенозна инфузия. Този метод е инвазивен, трудоемък и не се прилага в рутинната практика, това важи особено за педиатричната популация. Поради тази причина за определяне на GFR най-често се прилагат формули за изчисление, разчитащи на клирънса на ендогенни маркери, които се елиминират от организма изцяло чрез гломерулна филтрация. Актуализираната формула Bedside Schwartz от 2009 г. се препоръчва при изчисление на eGFR при деца, тя е валидирана при деца с ХБЗ с диапазон на GFR от 15 до 75 ml/min/1.73 m². Стойностите на eGFR, получени от тази формула, имат 80% шанс да бъдат в рамките на ± 30% от реалната GFR. Всичко това посочва ограниченията в използването на формула Bedside Schwartz в ранните фази на ДБЗ, когато се очаква гломерулна хиперфилтрация и стойности на GFR > 120 ml/min/1.73 m². Алтернативна формула представят Björk J et al. (2021), наречена СКД-ЕPI40. Тя е валидирана сред кохорта от 4005 деца и е базирана на уравнението СКД-ЕPI, но с коригиран спрямо възрастта и пола серумен креатинин към възрастта 40 години. В данните, изведени от Björk J et al. (2021), формулата СКД-ЕPI40 показва по-добра диагностична точност в сравнение с формула Bedside Schwartz, спрямо референтния измерен клирънс при деца с eGFR > 75 ml/min/1.73 m². Въпреки че резултатите са обещаващи, е необходимо да се натрупат допълнителни данни, за да се оцени клинична приложимостта на формулата СКД-ЕPI40 в различни педиатрични популации преди тя да влезе в рутинната практика. Изследването и валидирането на биомаркери, които се влияят от промени в гломерулната филтрация, също представлява алтернатива при пациентите със ЗД I. NGAL е белтък с ниска молекулярна маса, който се филтрира свободно през гломерулната филтрационна бариера, но в по-голяма част се реабсорбира в проксималните бъбречни каналчета.

Следователно без съпътстващо тубуларно увреждане не би следвало да се очаква концентрацията на циркулиращия NGAL да отразява наличието на гломерулна хиперфилтрация. Но все повече данни сочат, че увредата на тубулите е първичното нарушение, инициращо бъбречна дисфункция при пациентите със ЗД. Описват се редица патоморфологични изменения в тубулоинтерстициума, които предхождат или съпътстват патогномичните изменения в гломерула. Следователно в ранния стадия на хиперфилтрация на реналното увреждане при ЗД може да се очаква нарушение и във функцията на проксималните тубули, което да доведе до ограничена реабсорбция на филтрирания NGAL. В тази хипотетична ситуация повишената GFR би довела до намаление на концентрацията на pNGAL, но паралелно с повишение на uNGAL.

По-голяма част от проучванията, проведени при пациенти със ЗД I, оценяват връзката на pNGAL с промените в AER/ACR. В настоящото проучване не се установи статистически значима разлика в концентрацията на pNGAL между контролната група и кохортата със ЗД I, както и между пациентските групи, разделени спрямо ACR. В контраст с тези резултати Papadopoulou-Marketou N et al. (2017) установяват, че средните стойности на pNGAL в двете пациентски кохорти – деца и възрастни със ЗД I, се различават сигнификантно както помежду си (67.6 vs 85.2 ng/mL), така и със съответните им контролни групи (67.6 vs 24.6 ng/mL и 85.2 vs 76.1 ng/mL). Авторите определят pNGAL като биомаркер за бъбречна дисфункция, показващ отрицателна корелация с eGFR ($p < 0.001$). Zachwieja J et al. (2010) констатират сигнификантна разлика в средните стойности на pNGAL при деца със ЗД I с нормална AER спрямо контроли (867.4 vs 196.2 ng/mL). Авторите отбелязват, че нормалната AER при диабетици не изключва наличието на ДБЗ и посочват pNGAL като по-чувствителен маркер от AER за оценка на бъбречната функция при деца със ЗД (Табл. 35).

Таблица 35. Средни стойности/медиани на pNGAL при пациенти със ЗД I

Проучване	Възраст КГ/ТГ	КГ	A1	A2	Единици	+ ACR p<0.05	- GFR p<0.05	Метод
Lacquaniti A, 2013	35/37	46.4	193.7		ng/mL	Не	Не	ELISA Gentofte
Zachwieja J, 2010	-/13	196.2	867.4		ng/mL	Да	Не	ELISA CycLex Co
Papadopoulou, 2017	11/14	24.6	67.6		ng/mL	Не	Да	ELISA BioPorto
Papadopoulou, 2017	27/28	76.1	85.2		ng/mL	Не	Да	ELISA BioPorto
настоящо проучване	12/13	66.1 ^{1,2}	57.7 ^{1,3}	66.5 ^{2,3}	ng/mL	Не	Да CKDEPI	ELISA BioPorto

¹ липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$), ² липсва сигнификантна разлика между A2 и контролната група ($p > 0.05$), ³ липсва сигнификантна разлика между A2 и A1 ($p > 0.05$)

В настоящото проучване се установи, че в цялата кохорта ЗД I единствено стойностите на UNC са сигнификантно по-високи спрямо контролната група. Пациентите със ЗД I с повишен

ACR имат статически значимо по-високи резултати за uNGAL и UNC както спрямо контролната група, така и спрямо пациентите с нормален ACR. Пациентите с лош гликемичен контрол имат сигнификантно по-високи резултати за UNC както спрямо контролната група, така и спрямо тези с добър контрол на ЗД I.

Констатира се статистически значима положителна корелация между uNGAL с AER, ACR, HbA1c, BMI и триглицериди и между UNC с ACR, AER, HbA1c и триглицериди. Не се установи корелация между нито един от двата маркера с eGFR_(Bedside Schwartz) и eGFR_(CKD-EPI40).

ROC анализът демонстрира много добра диагностична ефективност на uNGAL и UNC в отдиференциране на пациенти със ЗД I с повишен ACR (A1 vs A2/A3) с AUC-ROC – 0.836 и 0.873. Диагностичната ефективност, с която стойност на uNGAL > 47.85 ng/mL успява правилно да идентифицира пациенти с албуминурия сред децата със ЗД I, е 86 %. Диагностичната ефективност, с която стойност на UNC > 3.86 µg/mmol успява правилно да идентифицира пациенти с албуминурия сред децата със ЗД I, е 89 %. UNC показва по-добра диагностична надеждност от uNGAL в диагностициране на пациенти със ЗД I с патологична албуминурия. Самостоятелното използване на UNC статистически значимо различава децата със ЗД I с ACR > 3 g/mol, като pNGAL не подобрява значимо тази прогностична стойност на маркера. Увеличението на UNC с 1 µg/mmol при пациент със ЗД I повишава 2.1 пъти вероятността лицето да има ACR > 3g/mol. Данните показват, че uNGAL и UNC са ефективни маркери за отдиференциране на пациенти със ЗД I с повишен ACR и за откриване на ДБЗ.

В съответствие с получените от нас резултати са и данните от литературните източници, посочващи предиктивната стойност на uNGAL и UNC в диагностиката на ДБЗ. Hafez MH et al. (2015) проучват ролята на uNGAL в диагностиката на ДБЗ при деца със ЗД I и посочват значимо по-високи резултати при пациенти с патологична албуминурия спрямо тези с нормална албуминурия и спрямо контролната група (39.14 vs 15.69 vs 5.66 ng/mL), установена е сигнификантна корелация между стойностите на uNGAL и ACR (p=0.001), но не и с eGFR. Определената от тях cut-off стойност на uNGAL е 11.75 ng/mL с AUC-ROC – 0.821 в разграничаване на пациенти със ЗД I с ACR > 3 g/mol. По-голяма част от проучванията, проведени при пациенти със ЗД I, оценяват ролята на маркера да диагностицира бъбречно увреждане при нормална AER/ACR, като изведените от тях cut-off стойности разграничават здравите деца от тези със ЗД I с нормоалбуминурия. Zachwieja J et al. (2010) констатираат сигнификантна разлика в средните стойности на uNGAL при деца със ЗД I с нормална AER спрямо контроли (420.0 vs 156.5 ng/mL). Ucaakturk A et al. (2009) описват сигнификантна разлика в стойности на UNC между пациенти със ЗД I с нормална AER спрямо референтната група (33.0 vs 13.3 ng/mL), но не установяват значима корелация между UNC с AER и eGFR (Табл. 36, Табл. 37).

Таблица 36. Средни стойности/медиани на uNGAL и UNC при пациенти със ЗД I

Проучване	Възраст КГ/ТГ	Показател	КГ	A1	A2	A3	Единици	+ ACR p<0.05	- GFR p<0.05	Метод
Lacquaniti A, 2013	35/37	uNGAL	6.5	25.5			ng/mL	Да	He	ELISA Gentofte
Zachwieja J, 2010	-/13	uNGAL	156.5	420.0			ng/mL	Да	He	ELISA CycLex Co
Yildirim ZY 2015	11/12	uNGAL	21.4	92.4 ²	145.9 ²		ng/mL	Да	-	ELISA BioVendor
Hafez MH, 2015	12/14	uNGAL	5.7 ¹	15.7 ¹	39.1		ng/mL	Да	He	Immunonp helometry
Kamel A, 2019	-	uNGAL	103.9 ¹	127.2 ¹	164.3		ng/mL	-	-	ELISA -
настоящо проучване	12/13	uNGAL	13.7 ¹	12.0 ¹	41.4		ng/mL	Да	He	ELISA Bioporto
Ucakturk A, 2009	13/13	UNC	13.3	33.0			ng/mg	He	He	ELISA BioVendor
Nielsen SE, 2010	51/56:54:49	UNC	74.0	146.0 ²	222.0 ^{2,3}	261.0 ³	pg/mmol	Да (A3)	-	ELISA Bioporto
Yildirim ZY, 2015	11/12	UNC	32.1	121.3 ²	104.4 ²		ng/mg	He	-	ELISA BioVendor
Настоящо проучване	12/13	UNC	1.47 ¹	1.64 ¹	8.49		µg/mmol	Да	He	ELISA Bioporto

¹ липсва сигнификантна разлика между A1 и контролна група ($p > 0.05$), ² липсва сигнификантна разлика между A2 и A1 ($p > 0.05$), ³ липсва сигнификантна разлика между A3 и A2 ($p > 0.05$)

Таблица 37. Диагностична ефективност на uNGAL и UNC в разграничаване на пациентите с ACR > 3g/mol сред лица със ЗД I

Проучване	показател	cut-off	единици	ДЧ	ДС	LR+	LR-	ППС	ОПС	ДЕ
Hafez MH, 2015	uNGAL	11.7	ng/mL	82%	67%	2.48	0.27			
Kamel A, 2019	uNGAL	132.5	ng/mL	100%	63%	2.70	<0.01			
настоящо проучване	uNGAL	47.8	ng/mL	52%	100%	>52.0	0.48	100%	84%	86%
настоящо проучване	UNC	3.86	µg/mmol	67%	98%	35.1	0.34	93%	88%	89%

ДЧ - диагностична чувствителност, ДС - диагностична специфичност, LR+ отношение на положителна вероятност, LR- отношение на отрицателна вероятност, ППС - положителната предсказваща стойност, ОПС - отрицателната предсказваща стойност, ДЕ – диагностична ефективност

В съответствие с получените от нас резултати за по-високи нива на UNC при пациенти с лош контрол на ЗД I са и данните от други проучвания. Hafez MH et al. (2015) докладват значима положителна корелация между uNGAL и продължителността на диабета, HbA1c и дислипидемията. Sołtysiak J et al. (2014) констатират значима разлика в стойностите на UNC между пациентите със ЗД I, разделени спрямо гликемичния контрол, като стойностите нарастват прогресивно в четирите групи от идеален до лош контрол.

ЗД I се диагностицира най-често с неговата поява, препоръчва се скринингът за ДБЗ да започне 5 години след поставяне на диагноза, чрез изследване на AER/ACR. Следователно биомаркери, които корелират с албуминурията са подходящи за откриване на ДБЗ. Данните в

нашето проучване показват, че маркерите uNGAL и UNC притежават необходимата диагностична ефективност за отдиференциране на пациентите с ACR > 3 g/mol сред лица със ЗД I. Това очертава обещаващата роля на uNGAL и UNC в диагностиката на ДБЗ сред пациентите със ЗД I. Констатира се, че стойностите на uNGAL и UNC корелират с тежестта на албуминовата екскреция (ACR) и с маркери оценяващи контрола на ЗД – HbA1c и триглицериди, следователно могат да бъдат и обещаващи маркери за оценка на риска от прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД I (Табл.38).

Таблица 38. Определените в настоящото проучване cut-off стойности за ДБЗ при ЗД I

Показател	cut-off	единици	ДЧ	ДС	LR+	LR-	ППС	ОПС	ДЕ
uNGAL	47.85	ng/mL	52%	100%	> 52.0	0.48	100%	84%	86%
UNC	3.86	µg/mmol	67%	98%	35.1	0.34	93%	88%	89%

Нашето проучване констатира, че концентрацията на NGAL в урината е зависима и от ИПП и наличието на левкоцитурия. При 5-ма от насочените пациенти със ЗД II (\bar{x} - uNGAL = 248.76 ng/mL и UNC = 47.87 µg/mmol) и при 3-ма със ЗД I се констатира сигнификантна левкоцитурия и са изключени от последващата обработката на данните (\bar{x} - uNGAL = 128.60 ng/mL и UNC = 12.23 µg/mmol). Получените резултати за uNGAL и UNC са значимо по-високи от определените референтни граници. NGAL е острофазов протеин, чиято концентрация в урината се повишава в хода на ИПП, което се дължи на освобождаването му от активираните неутрофили и повишената му експресия от увредените тубуларни клетки. Бъбречните епителни клетки секретират главно мономерната форма, докато неутрофилите освобождават главно димерната форма. Към момента използваните антитела в имуноанализите не могат да различат мономерната от димерната форма на NGAL, което намалява специфичността на маркера в диагностиката на ДБЗ. Следователно при интерпретация на резултатите на uNGAL и UNC трябва да отчита влиянието на левкоцитурията и ИПП върху стойностите на маркера и съотношението.

Резултати в настоящото проучване са в съответствие с данните в литературата, които представят NGAL като маркер с добър диагностичен профил в диагностиката на ДБЗ. Въпреки това възприетите от нас критерии за ДБЗ са промени в лабораторните показатели eGFR и ACR, следователно не можем да оценим ролята на NGAL като по-ранен маркер за настъпване на бъбречна дисфункция спрямо тези класически показатели за бъбречна увреда. Допълнително отчитаме редица ограничения и лимитиращи фактори, като аналитичните характеристики на анализа при определяне на ниски стойности на NGAL, възможната вариабилност в екскрецията на албумин и малкия брой пациенти със ЗД I с ДБЗ.

VI. ИЗВОДИ

На основание извършения от нас анализ, ние формулираме следните изводи:

1. Данните от верифицирането на имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL на фирма Biorpoto на биохимичен анализатор ADVIA 1800 показват много добри аналитични характеристики, отговарящи на националните и международни стандарти. Тестът демонстрира по-добра аналитична надеждност при определяне на високи в сравнение с ниски концентрации на анализа и не успява да детектира с необходимата точност концентрации на NGAL < 12 ng/mL.
2. Представянето на резултатите за uNGAL като съотношение спрямо uCreatinine позволява по-добра сравнимост на резултатите, както и получаване на по-надеждни резултати при нестандартизирани условия за взимане на биологичен материал, като по този начин се постига компенсиране на вариациите от дневните колебания в осмоларитета на урината.
3. При определяне на референтните граници за българската популация при възрастни лица се очерта връзка между концентрацията на pNGAL и възрастта, която корелира с възрастово обусловените промени в eGFR.
4. При определяне на референтните граници за българската популация при възрастни лица се установи статистически значима разлика между двата пола в стойностите на UNC. Жените имат по-високи резултати за UNC, което е паралелно на по-ниските стойности на креатинин в урина.
5. При пациентите със ЗД II без ДБЗ се установи статистически значима разлика в стойностите на UNC между двата пола. Жените имат по-високи резултати за UNC, което е паралелно на по-ниските стойности на креатинин в урина.
6. При пациентите със ЗД II концентрацията на pNGAL корелира с понижението на eGFR, докато промените в стойностите на uNGAL и UNC – с повишението на ACR. Самостоятелното използване на pNGAL с добра диагностична ефективност отдиференцира пациентите със ЗД II с понижена гломерулна филтрация, а UNC с много добра ефективност тези с повишен ACR.
7. При пациенти със ЗД II се установи, че от трите оценявани показателя – pNGAL, uNGAL и UNC, с най-висока прогностична стойност за диагноза на ДБЗ са промените в стойностите на UNC. pNGAL не подобрява прогностичната стойност на UNC като маркер за диагноза на ДБЗ. Самостоятелното използване на полово диференцираните cut-off стойности на UNC статистически значимо и с много добра диагностична ефективност различава пациенти с бъбречно увреждане сред лица със ЗД II.

8. При пациенти със ЗД II се установи, че pNGAL подобрява прогностичната стойност на UNC при стадиране на ДБЗ. При отчитане на промените в стойностите на pNGAL и UNC се постига ефективна прогноза и стратификация на ДБЗ при пациенти със ЗД II.
9. При пациентите със ЗД I – деца, се констатира наличие на бъбречно увреждане при малък брой пациенти в съответствие с относително малката давност на ЗД I.
10. При пациентите със ЗД I концентрацията на pNGAL корелира с понижението на eGFR, докато промените в стойностите на uNGAL и UNC с повишението на ACR. Самостоятелното използване на UNC с много добра ефективност различава пациентите със ЗД I с повишен ACR.
11. При пациенти със ЗД I се установи, че от трите оценявани показателя – pNGAL, uNGAL и UNC, с най-висока прогностична стойност за диагноза на ДБЗ са промените в стойностите на UNC. pNGAL не подобрява значимо прогностичната стойност на UNC като маркер за диагноза на ДБЗ. Самостоятелното използване на определената cut-off стойност на UNC статистически значимо и с много добра диагностична ефективност различава пациенти с бъбречно увреждане сред лица със ЗД I.
12. При пациенти със ЗД I се установи, че самостоятелното използване на UNC има добра прогностична стойност и най-добра клинична приложимост при прогноза и стадиране на ДБЗ.
13. При интерпретация на резултатите за uNGAL и UNC е необходимо да се отчита влиянието на ИПП и левкоцитурията.

VII. ПРИНОСИ

Приноси с теоретичен характер

1. Потвърдена е високата аналитична надеждност на NGAL Test™ на фирма Bioporto при определяне концентрацията на NGAL в плазма и урина.
2. Установи се, че представянето на резултатите за uNGAL като съотношение спрямо uCreatinine позволява по-добра сравнимост на резултатите, както и получаване на по-надеждни резултати при използване на spot урина.
3. Установи се, че при лица без бъбречно увреждане има полово зависимост в стойностите на UNC.
4. Установи се, че при пациенти със ЗД концентрацията на pNGAL корелира с понижението на eGFR, докато тази на uNGAL и UNC – с повишението на ACR.
5. Установи се, че при пациенти със ЗД II самостоятелното използване на UNC е ефективен маркер за диагноза, а едновременното приложение на pNGAL и UNC за прогноза на ДБЗ.
6. Установи се, че при пациентите със ЗД I самостоятелното използване на UNC е ефективен маркер за диагноза и прогноза на ДБЗ.
7. Установи се, че концентрацията на uNGAL е зависима и от ИПП и левкоцитурията.

Приноси с практико-приложен характер

1. За първи път в България е извършено аналитично верифициране на имунотурбидиметричен анализ за определяне на NGAL.
2. За първи път в България са определени полово диференцирани референтни граници на pNGAL, uNGAL и UNC при възрастни лица, определени чрез клинично приложимия имунотурбидиметричен анализ.
3. За първи път в България са определени референтни граници на pNGAL, uNGAL и UNC при деца, определени чрез клинично приложимия имунотурбидиметричен анализ.
4. За първи път в българска кохорта от пациенти със ЗД II е оценена прогностичната роля на NGAL като маркер за диагностика на ДБЗ. Определени са cut-off стойности, които могат да бъдат приложени в рутинната практика.
5. За първи път в българска кохорта от пациенти със ЗД II е оценена прогностичната роля на NGAL като маркер за прогноза на ДБЗ.
6. За първи път в българска кохорта от пациенти със ЗД I е оценена прогностичната роля на NGAL като маркер за диагностика на ДБЗ. Определени са cut-off стойности, които могат да бъдат приложени в рутинната практика.
7. За първи път в българска кохорта от пациенти със ЗД I е оценена прогностичната роля на NGAL като маркер за прогноза на ДБЗ.

VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Шефкет С, Бочева Я. ПРЕДИКТИВНА РОЛЯ НА НЕУТРОФИЛ ГЕЛАТИНАЗА-АСОЦИИРАН ЛИПОКАЛИН КАТО РАНЕН МАРКЕР ЗА БЪБРЕЧНО УВРЕЖДАНЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ. *Актуална нефрология*. 2021. XV.1:51-61.
2. Шефкет С, Бочева Я. РЕФЕРЕНТНИ ГРАНИЦИ ЗА БЪЛГАРСКАТА ПОПУЛАЦИЯ НА НЕУТРОФИЛ ГЕЛАТИНАЗА-АСОЦИИРАН ЛИПОКАЛИН ИЗМЕРЕНИ ЧРЕЗ ИМУНОТУРБИДИМЕТРИЧЕН АНАЛИЗ. *Нефрология, диализа и трансплантация*. 2021; 4:30-39.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Shefket S, Bocheva Y, Popcheva G, Boyadzieva M. uNGAL - an Early Marker for Kidney Injury in patients with type I diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*. 2019.V.493:S294-295.
2. Shefket S, Bocheva Y, Popcheva G, Galcheva S. Association between NGAL and glycemic control in patients with type I diabetes mellitus. *Turkish Journal of biochemistry* 2019. V.44 (S3).

БЛАГОДАРНОСТИ

на всички, които допринесоха този труд да се осъществи:

- научния ми ръководител доц. д-р Яна Бочева - за високия професионализъм, изключителната и непрекъсната подкрепа, с които ми помогна през всички етапи от работния процес;
- колегите и екипа от МДЛ на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна;
- колегите от Клиниката по ендокринология и болести на обмяната и Първа детска клиника към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна;
- всички пациенти, които се съгласиха да участват в проучването;
- моето семейство.