

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ
УНС ПО ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

д-р Стоянка Танчева Илиева

ПАТОФИЗИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ
НА АКТИВНИЯ ТУБУЛО - ИНТЕРСТИЦИАЛЕН
БАКТЕРИАЛЕН НЕФРИТ ПО КЛИНИЧНО -
ЛАБОРАТОРНИ ДАННИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „**доктор**“

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ
„Патофизиология на животните и човека“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: Доц. Д-р. Радко Радев д.м.

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ: Проф. Д-р. Ганка Бекярова д.м.н.

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ: Проф. Д-р. Връбка Орбецова д.м.н.
Доц. Д-р. Валентин Мушков д.м.

Варна, 2018

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ
УНС ПО ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

д-р Стоянка Танчева Илиева

ПАТОФИЗИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ
НА АКТИВНИЯ ТУБУЛО - ИНТЕРСТИЦИАЛЕН
БАКТЕРИАЛЕН НЕФРИТ ПО КЛИНИЧНО -
ЛАБОРАТОРНИ ДАННИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „**доктор**“

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ
„Патофизиология на животните и човека“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: Доц. Д-р. Радко Радев д.м.

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ: Проф. Д-р. Ганка Бекярова д.м.н.

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ: Проф. Д-р. Връбка Орбецова д.м.н.
Доц. Д-р. Валентин Мушков д.м.

Варна, 2018

Дисертационният труд е написан на 144 страници и съдържа 21 фигури и 35 таблици. Библиографската справка включва 487 заглавия, от които 28 на кирилица и 459 на латиница.

Дисертацията е обсъдена и насочена за защита от катедрен съвет на Катедрата по „Физиология и патофизиология“ към Медицински факултет на Медицински университет - Варна.

Научно жури:

1. Проф. д-р. Връбка Цекова Орбецова д.м.н.- външен член
2. Доц. д-р. Валентин Любомиров Мушеков д.м. – външен член
3. Доц. Д-р. Анна Василева Цончева д.м. – външен член
4. Доц. д-р. Калинка Мирчева Демирева д.м. – външен член
5. Доц. д-р. Радко Златков Радев д.м. – вътрешен член

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2018г. от часа ваудитория на Медицински университет - Варна, ул. “Марин Дринов” N 55, на открито заседание на Научното жури.

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

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
ВЪВЕДЕНИЕ	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	9
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	11
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	16
1. Патофизиологичните аспекти на лабораторния анализ – „новата парадигма на медицината“	16
2. Изследване на лабораторни параметри при експериментален модел на активен тубуло-интерстициален бактериален нефрит (аТИБН)	17
3. Допълнение към алгоритъма за клинично лабораторни изследвания при активен тубуло-интерстициален бактериален нефрит (остър или обострен пиелонефрит)	29
4. Заключително обсъждане	46
ИЗВОДИ	56
НАУЧНИ ПРИНОСИ	58
Приноси с оригинален характер	58
Приноси с потвърдителен характер	58
ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	59
Публикации в научни списания	59
Публикувани резюмета на научни съобщения и доклади	59

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

аТИБН	- активен Тубуло-интерстициален бактериален нефрит
ИПП	- Инфекции на пикочните пътища
МКБ	- Международна класификация на болестите
ОПН	- Обострен пиелонефрит
ПН	- Пиелонефрит
ПОС	- Пикочо-отделителна система
СЗО	- Световна здравна организация
СУЕ	- Скорост на утаяване на еритроцитите
ТИБН	- Тубуло-интерстициален бактериален нефрит
УМБАЛ	- Университетска многопрофилна болница за активно лечение
ХОПН	- Хроничен обострен пиелонефрит
ANOVA	- Analysis Of Variances
ATCC	- Microbiology catalogue
β-2 M	- β-2 Microglobulin
CLSI	- Clinical & Laboratory Standards Institute
cfu	- Colony-forming unit
CRP	- C- reactive protein
EG	- Europiens Guidelines
EUCAST	- European United Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
GMP	- Good Medical Practis
GRADE	- Grades of Recommendation Assessment, Development, and Evaluation
H & E	- Hematoxylin-Eosin
Hos POC	- Hospital Point of Care
IFCC	- International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
PMN	- Polymorphonuclear neutrophil
REFVAL	- Reference validation
ROC	- Receiver Operating Characteristic
SPSS	- Statistical Package for the Social Sciences
U alb	- Urinary albumine
U β-2 M	- Urinary beta 2-microglobuline
U Cr	- Urinary creatinine
U p	- Urinary proteine
UTIs	- Urological tract infections
VUR	- Vesicoureteral reflux
WBC	- White blood cells
UTI	- Urinary tract infection

*Посвещавам на моя баща
с признателност за безусловната му вяра в мен
и на всички свои учители, между които
на първо място са моите деца !*

Винаги ще Ви благо-даря !

ВЪВЕДЕНИЕ

Бактериалните инфекции на бъбреците и уринните пътища – УТИ (urological tract infections -UTIs) често се проявяват клинично с твърде оскъдна симптоматика и незначителни оплаквания, поради това се диагностицират трудно и относително късно или са обект на хипердиагностика. Съвременната клинична лаборатория в областта на нефрологията и урологията, като медицина на доказателствата (*evidens-based medicine*), утвърждава Европейските насоки за уринен анализ (Guder W. G. et al., 2001), адаптирани към условията на практическата медицина, за по-голяма надежност на тяхната информативна интерпретация и така задоволява изискванията на добрата медицинска практика (GMP).

Указанията за уроинфекции са публикувани за пръв път 2001г. (K. Naber (chairman), M. Bishop et al., 2001) от Европейската асоциация по урология-EAU (European Association of Urology (EAU) (NKDEP., 2013), като Urological Infections Guidelines-Panel-2017; 2018 (обединява насоките от 2015 и 2016 (NICE., 2017) и следва да бъде актуализирана през 2018, обхващайки всички въпроси, свързани с УТИ.

Бактериалният тубуло-интерстициален нефрит /ТИБН/ принадлежи към групата на заболявания на бъбреците, при които се засяга предимно тубуларната и интерстициалната им тъкан с изменения от възпалително-токсичен характер. Той е остро или хронично неспецифично възпалително заболяване на интерстициума, тубулите на бъбрека и/или на бъбречното легенче(пиелон) /пиелонефрит-ПН, pyelonephritis/, с последващо засягане на кръвоносните съдове и гломерулите, което е резултат от директна бактериална инвазия. МКБ-10 (СЗО) (МКВ., 2007).

Прижизнена диагноза на заболяването се поставя трудно (B. Foxman et al., 2002) и често не може да бъде разграничена от възпалителни процеси

в други части на урогениталната система.

Последиците за организма от една късно открита или недоизлекувана инфекция в различните отдели на пикочо-отделителната система (ПОС) са различни. Това прави много актуално практическото приложение на идеята за оценка на активността на ТИБН чрез надеждните и неагресивни клинично-лабораторни тестове.

Правилното и достатъчно лечение на инфекциите на пикочните пътища е от голямо значение за по-нататъшното здраве на човека (G. Donoso et al., 2004).

Уточняването на локализацията на инфекциозния процес и монитора на неговата активност са важни с оглед на лечение или последващите усложнения.

Като диагноза ТИБН влиза в урологичните Guidelines под рубриката *UTIs*, но с оглед усложненията на организма, до които той може да доведе, всички видове изследвания, които биха го разграничили от процеси в останалите части ПОС са от особено важно значение. През 2007 г. в университета „Джордж Вашингтон“ е проведен симпозиум по тези въпроси.

Пациенти и лекари се нуждаят от правилна интерпретация на съществуващите (M. Tonelli et al., 2011; A. Zhang et al., 2012) и от нови биомаркери, които бързо и надеждно да визират локализацията на възпалението при УТИ. Проучванията в тази област продължават и този въпрос е предизвикателство за изследователи и клиницисти (J. Kranz, S. Schmidt et al., 2017; J. Kranz, S. Schmidt et al., 2018).

В своята практика, с такъв род болни постоянно се срещат семейните лекари, интернистите, педиатрите, хирурзите, нефролозите, акушер-гинеколозите, уролозите, т.е. лекарите от почти всички медицински специалности. Този широк кръг на ангажираност от страна на лекари от доболничната и болнична помощ прави проблема за точната и бърза диагностика на това заболяване много значим и актуален. Наличието на пикочна инфекция представлява голям здравен риск. Ранната диагноза на ТИБН е свързана с активно търсене на проявените и латентни форми на заболяването с помощта на прецизни скринингови методи за епидемиологично проучване (L. Shallcross, K. Gaskell et al., 2018).

ПН не трябва да бъде подценяван (M. E. Falagas et al., 2007), тъй като много често води до последваща вторична хипертония (D. C. Harris et al., 2000), анемия, уросепсис и бавно, но сигурно инвалидизира бъбрека. Към опасните усложнения на ТИБН се отнасят нефросклерозата и хроничната бъбречна недостатъчност (D. V. Enikeev, P. Glybochko et al., 2017).

Въпросът за бързото и точно установяване на локализацията на възпа-

лението и надеждното доказване на ангажирането в този процес на бъбрека е особено актуален при бъбречната трансплантация (*S. Fujita et al., 2005*).

Доброто познаване на причините и механизмите на възникване, развитие и изход от заболяването е в основата на правилния анализ и адекватните действия на лекуващия лекар. Като фундаментална наука, Патолофизиологията дава в ръцете ни това силно оръжие, разкривайки етиологията и патогенезата на болестния процес.

В актуалния профил на медицински специалисти, Клиничната лаборатория е една от най-бързо развиващите се в техническо и информационно отношение (Т. Шипков и др., 1996; М. Шишенков, 2004; Н. Garin et al., 2007). Естеството на нейния продукт не предполага агресивна намеса върху пациента, няма странични ефекти, изследването се реализира бързо, като добрата стандартизация води до достоверни резултати, чиято информативност е функция от компетентността на лекаря. Анализът може да даде ценна информация, съкращаваща времето за поставяне на диагноза.

Настоящото изследване представлява опит за оптимизиране оценката на бактериалния тубуло-интерстиционален нефрит по клинично-лабораторни данни. Проследени са научните и клинично прилагани лабораторни параметри за диагностика, мониторинг и прогноза на това заболяване, разгледани в контекста на неговата патогенеза (С. Танчева, 2010). Подбрана е референтна група, съгласно изискванията на IFCC- CLSI и водейки се от Европейските препоръки (С. А. Burtis et al., 2011), са изработени референтни граници за някои параметри на протеинурия у нас (St. Tancheva et al., 2017). Приложен е модифициран метод за анализ на уринен седимент (С. Танчева и др., 2007) и е направен опит за изработване на алгоритъм при диагностициране на бактериалния тубуло-интерстициален нефрит, както и анализиране на информативната стойност на проследените лабораторни тестове, чрез изследването им при опитен модел на тубуло-интерстициален бактериален нефрит (St. Tancheva et al., 2011).

Трудът представлява обобщение на повече от 15-годишни целенасочени изследвания върху диагностиката и проследяването на активния ТИБН чрез възможностите на лабораторния анализ, както и експериментален модел на остър хематогенен пиелонефрит. Целта на нашият пилотен-експериментален модел бе да докаже корелацията между предложените клинично – лабораторни изследвания и потвърдената хистоморфологично картина на ТИБН.

За реализирането на всички тези идеи изразяваме нашата дълбока благодарност на клиниките по нефрология, урология, пропедевтика, микро-

биология, лаборатория, хистопатология и образна диагностика към УМ-БАЛ „Св. Марина“ и МБАЛ „Св. Анна“ - Варна на катедрата по патофизиология, анатомия, хистология, патоанатомия и фармакология в МУ-Варна, както и специално на проф. Смирнов и проф. И. Г. Каюков от ГМУ- Санкт Петербург.

И накрая, разбира се няма да пропуснем да отбележим, че този труд реализира основния стремеж на своя автор: патофизиологията и клиничната лаборатория да имат тясна връзка с клиничната практика и да порождават полезни интердисциплинарни дискусии, от които да следват реални медицински действия, в полза на болния !

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

ЦЕЛ

Целта на настоящия труд е:

Да се изследва диагностичната надеждност и се извърши анализ на някои актуални клинично - лабораторни параметри в процеса на диагнозата и проследяването на тубуло - интерстициалния бактериален нефрит, като се оценят от патофизиологична гледна точка възможностите за мониториране на неговата активност.

ЗАДАЧИ

За реализирането на тази цел бяха набелязани следните задачи:

1. Изработване на експериментален модел на остър хематогенен ТИБН с изследване при него на:
 - промяната в броя и морфологията на WBC в кръв на контролните и опитни животни
 - определяне промяна на нивото на CRP в кръв на контролните и опитни животни
 - ниво на бета -2 микроглобулин (β -2 M) в урината при контролната и опитната група в различни етапи от експеримента,
 - изследване на седимента на урината на контролните и опитни животни за наличие на морфологични форми на активни левкоцити чрез наш цитохимичен метод за визуализирането им.
 - хистоморфологична картина на остър ТИБН при опитните животни
2. Прецизиране на алгоритъм за клинично - лабораторни изследвания при активен бактериален тубуло- интерстициален нефрит (активен пиелонефрит):
 - Аprobация (администриране) на някои уропротеинни маркери при прилагане на Европейските насоки за уринен анализ при референтна група здрави лица: уропротеини (общ протеин в урина, представен в дименсии: U protein g/L; U protein g/mol Cr; U protein g/g Cr; U protein g/mOsm, албумин в урина, представен в дименсии: U albumin mg/L; U albumin mg/mol Cr; U albumin mg/g Cr; U albumin mg/mOsm, beta 2 M

в урина, представен в дименсии: U β -2 M mg/L; U β -2 M mg/mol Cr; U β -2 M mg/g Cr; U β -2 M mg/mOsm.;

- Изследване на диагностичната ефективност на уропротеинни маркери: общ протеин в урина, албумин в урина и β -2 M в урина при активен ТИБН с помощта на ROC анализ на SPSS - статистическа интерпретация.
- Изработване на бърз и надежден цитохимичен метод за откриване на активни левкоцити (glitter cells) в уринен седимент при активен ТИБН (при експерименталния модел на активен ТИБН и при пациенти с активен ТИБН).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. МАТЕРИАЛ

1.1. Експериментален модел при животни

Експерименталното проучване на остър хематогенен ТИБН беше проведено върху 48 мъжки бели плъха, порода Wistar, от които 36 опитни и 12 контроли. Животните бяха с тегло 200-220g, отглеждани при стандартни условия- свободен достъп до стандартна храна и вода ad libidum. Всички експерименти с животните бяха проведени съгласно изискванията на Европейската конвенция за защита на експерименталните животни (Protection of animals used for experimental purpose, council Directive 86/609 EEC of November 1986; Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of September 2010) и наредба N 15 на Министерството на земеделието и горите „За защита и хуманно отношение към опитните животни,, (ДВ бр. 17 от 24.02.2006 г.).

Плъховете бяха разделени на две групи: контролна (n=12) и опитна (n=36). Чрез интравенозно канюлиране на опасната вена на опитните животни е инжектирана смесена бактериална култура в доза 0,5ml /100g тегло, получена in vitro от 24 h бульонна суспензия на *St. Aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu /ml.

Отчете се брой и морфология на WBC и CRP в кръвта на опитните експериментални животни- преди и 24 часа след инжектиране с бактериалната суспензия. При тях се направи и микробиологичен анализ на урокултура.

Контролните животни, участващи в експеримента, бяха инжектирани с равно по обем, на обема на комбинираната бактериална суспензия, количество физиологичен разтвор и бяха подложени на същите по вид и хронология лабораторни изследвания.

От 14. до 18. ден през два дни са декапитирани след наркоза с диетилов етер по 2 животни от контролната група, а от 14. до 18. ден през два дни са декапитирани след наркоза по 5 от опитните животни. Бъбреците на декапитираните животни са фиксирани в 10% неутрално буфериран формалин. Фиксираните тъкани са поставени в парафин, нарязани, поставени върху микроскопски стъкла и оцветени с hematoxylin-eosin (H & E). Проведено е светлинно-микроскопско хистопатологичното изследване (микроскоп Zeiss) и резултатите са документирани с микрофотокамера Olympus.

Петкратно (на 10; 12; 14; 16 и 18 ден) се изследва урина, получена по стерилен път от третираните животни: биохимично - чрез сухи тестове и изследване на седимент - цитохимичен метод за доказване на *glitter cells*.

На 18-я ден от експеримента при опитните животни и контролите се изследва ниво на β -2 микроглобулин в урина, като показателите се анализират заедно с цито и хисто-морфологичните промени на бъбречната патология.

1.2. Група здрави лица

Аprobацията на някои уропротеинни маркери при прилагане на Европейските насоки за уринен анализ бе проведена на референтна група от 130 здрави лица. Мъже - 72 (55,4%), Жени - 58 (44,6%). Средна възраст - 36,49 \pm 13,995 г. - минимална: 20 г.; максимална: 65 г./, подбрани според стандарта за референтна група /IFCC/, след информирано съгласие, на възраст от 20 до 65 години, на директен принцип. Подборът на лицата бе предварително съобразен с техния пол, възраст, анамнеза и статус: те са клинично здрави, не споменават фамилни заболявания, трикратното измерване на кръвното им налягане е в границите на нормата, не съобщават за диабет - стойностите на измерената им кръвна захар е в референтната област, те са с нормални нива на креатинин и урея в кръвта, не съобщават за бъбречни заболявания и сухите уринни тесове не показват наличие на WBC, RBC, бактерии и положителен белтък. В момента не вземат никакви лекарства, не злоупотребяват с алкохол и упойващи вещества, жените не са бременни и не кърмят, не вземат контрацептиви, не са в мензис. Лицата нямат прекомерно физическо натоварване, не работят при вредни условия на труд или при прекомерен стрес. Проследените лабораторни параметри бяха:

Кръв: WBC, CRP;

Урина: общо ниво на протеини в урина, микроалбумин, β -2 микроглобулин, осмолалитет и креатинин в първа порция сутришна урина, както и отношението на посочените протеини към екскреционното креатининово ниво и уринния осмоларитет.

1.3. Група пациенти с клинично доказан активен ТИБН

Изследването на уропротеинни маркери за активен ТИБН при прилагане на Европейските насоки за уринен анализ при пациенти с клинично доказан активен ТИБН бе направено на група от 105 болни от клиниките по нефрология, урология и пропедевтика на УМБАЛ „Св. Марин“ и МБАЛ

„Св. Анна“ - Варна за периода 2001-2017 година. Мъже - 57 (67.6%); жени - 48 (32.4%), на възраст от 20 до 65 години, разделени по пол и възраст. За целите на изследванията бе получено разрешението на „Етичната комисия“ към МУ „П. Стоянов“ - Варна.

Проследените лабораторни параметри бяха: Кръв: WBC, CRP, СУЕ; Урина: общо ниво на протеини в урина, микроалбумин, β -2 микроглобулин (U β -2 M), осмолалитет и креатинин в първа порция сутришна урина, както и отношението на посочените протеини към екскреционното креатининово ниво и уринния осмолалитет.

Уропротеините бяха представени в следните дименсии: U protein g/L; U protein g/mol Cr; U protein g/g Cr; U protein g/mOsm, албумин в урина, представен в дименсии: U albumin mg/L; U albumin mg/mol Cr; U albumin mg/g Cr; U albumin mg/mOsm, beta 2 M в урина, представен в дименсии: U β -2 M mg/L; U β -2 M mg/mol Cr; U β -2 M mg/g Cr; U β -2 M mg/mOsm..

Проследена бе диагностичната ефективност на уропротеинни маркери: общ протеин в урина, албумин в урина и β -2 M в урина при активен ТИБН с помощта на ROC анализ на SPSS - статистическа интерпретация.

За визуализиране на левкоцитните популации в уринния седимент на пациентите с клинично доказан активен ТИБН използвахме изработения от нас бърз и надежден цитохимичен метод за откриване на активни левкоцити (glitter cells) в уринен седимент.

2. МЕТОДИ

Събирането и обработката на пробите става по предварително дефинирани правила, отговарящи на европейските изисквания (EG), които са:

Урина

- от пациенти, взета след подходящ тоалет и изследвана 1/2 до 1 h след отделяне;
- от експериментални животни чрез катетеризация със стерилни катетърни тръбички.

Уринен седимент

- получен от пациенти при първа порция, средна микция сутрешна урина, престояла най-малко 4-6 h в пикочния мехур. Центрофугиране на 10ml урина на 400 g за 5 min., 9.5 ml от супернатантата се отстранява чрез отсмукуване. Този седимент е готов за нативен препарат, който да бъде гледан на различно увеличение оцветен или не.
- от експерименталните животни чрез катетеризация със стерилни катетърни тръбички- урината се седиментира при същите условия, отпипе-

тира се супернатантата и се работи с получената уринна утайка.

Пълна кръв и серум-

- от кубиталната вена при пациентите и при контролната група,
- от опасната вена при експерименталните животни.

Чиста култура - бактериален щам – 24 h бульонна суспензия – *St. aureus* получен *in vitro* в концентрация 1.5x10⁶ cfu /ml и *E. coli* - 1.0x10⁶ cfu /ml.

2.1. Хематологични методи

- левкоцити в кръв - кондуктометрия, проточно - цитометричен - Hellios; Sysmex - SF 3000

2.2. Биохимични методи

- С-реактивен протеин - имунотурбидиметрия - антиген - антитяло, с фотометричен завършек, пропорционален на протеиновата концентрация - Hitachi 902; Olympus 400
- В-2 микроглобулин в серум и урина – имунотурбидиметрия - Hitachi 902; Olympus 400
- креатинин в серум и в урина- Jaffe кинетично-колориметричен с пикринова киселина (за урина - десетократно разреждане) - Hitachi 902; Olympus 400
- У общ белтък - пирогалол и молибдат с колориметричен завършек - Hitachi 902; Olympus 400
- У микроалбумин – имунотурбидиметрия - Hitachi 902; Olympus 400
- У осмолалитет- криоскопия - осмометър на Knauer
- Суха химия на урина - Arcrey –Roche.

2.3. Цитохимични методи

- оцветяване с *methylenblau* - Нашият метод включва суправитално оцветяване с 1% р-р на *methylenblau* (Methylthioniumchlorid), при което материал (урина) и оцветител се поставят в равни съотношения, размесват се и се оставят във влажна камера за 3-5 min, след което една капка се поставя върху предметно стъкло, притиска се с покривно стъкло и се наблюдава на различни увеличения: /10x10; 10x40; 10x100/. При използване на цитохимична методика за определяне на морфологията на клетките в уринния седимент, обектите могат да бъдат наблюдавани на обикновен светлинен микроскоп - визуално-оптично - отчитане -Zeiss, x400, x1000.

- оцветяване haematokskillin - eosin - отчитани - Zeiss, x400, x1000.

2.4. Хистологичен метод

- След експериментите вътрешните органи на животните бяха инспектирани макроскопски. Бяха подготвени препарати от вътрешни органи - слезка, черен дроб, тънко черво, бъбрек и оцветени с хематоксилин - еозин. Препаратите бяха огледани на светлинен микроскоп за възможни септични огнища.
- хематоксилин - еозин -оцветяване, отчитани- визуално- оптичен - Zeiss, x100; x400; x1000

2.5. Микробиологични методи

- урокултура

2.6. Статистически методи

При статистическата обработка на резултатите бяха изчислени относителният дял при определяне нивата на показателите, средни стойности, статистическото разсейване и статистическата грешка при определяне на средни нива на показателите.

- Дескриптивна статистика - алтернативен анализ
- Student's t-test
- корелационен анализ
- корелационен коефициент на Pearson
- коефициент на рангова корелация на Spearman
- вариационен анализ - еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's Multiple Comparison Post test

При всички анализи стойностите на $p < 0.05$ се приемат като сигнификантни за отхвърляне на нулевата хипотеза (H_0).

Резултатите са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната ($\bar{x} \pm S\bar{x}$).

Данните са обработени с помощта на софтуерните продукти: GraphPad Prism (ver.2.01, GraphPad Software, Inc.), SPSS (ver. 19.0), REVAL - Solberg, ROC-curve. Графичното представяне на резултатите е направено чрез програма Excel.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Патофизиологичните аспекти на лабораторния анализ – „новата парадигма на медицината“

През 2001 год. колектив от лекари с различни специалности - патофизиология, клинична лаборатория, вътрешни болести, нефрология, фармакология, микробиология, образна диагностика и патоанатомия направихме опит да създадем експериментален модел на хематогенен тубуло - интерстициален бактериален нефрит (ПН). Беше времето, когато трансплантационната нефрология у нас набираще отново сили. Нашата идея бе да се опитаме да докажем информативността на комбинация от лабораторни тестове, които биха могли да се ползват лесно, бързо, удобно и евтино за диагностика и мониториране на остър възпалителен процес, развиващ се в самия бъбрек. За да сме сигурни, че в уринния анализ не интерферират възпалителни компоненти, идващи от долните отдели на отделителната система решихме моделът да възпроизвежда хематогенен (апостематозен) активен тубуло-интерстициален бактериален нефрит (остър пиелонефрит).

За целта използвахме комбинация от микробни щамове с тропизъм към отделителната система.

Направихме комбинирано хематогенно въвеждане на *St. aureus* и *E. coli* Патологията в бъбречните каналчета бе обективизирана хистоморфологично, както и чрез повишените нива на β -2 микроглобулин и наличието на активни левкоцити (glitter cells) в урината.

Впоследствие решихме да проверим в каква степен тези аналитични тестове реализират идеята клиничната лаборатория бързо и надеждно да:

- насочва клиничното мислене;
- потвърждава клиничното дирене;
- проследява клиничния ефект (доколкото това е възможно) в правилна насока по отношение на активния ТИБН (остър ПН).

2. Изследване на лабораторни параметри при експериментален модел на активен тубуло-интерстициален бактериален нефрит (аТИБН)

За модела подбрахме 48 мъжки плъха, порода Wistar (200 - 250 g), които изкуствено заражихме i.v. през опашната вена с комбинирана бактериална култура–24h бульонна суспензия *St. Aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml. В различни етапи от експеримента, животните, които отговаряха на нашите изисквания, изследвахме за различни лабораторни параметри. Животните, които не показаха кореспондиращ с очакванията отговор, бяха отстранени от по-нататъшно участие в експеримента. Показателите, които изследвахме при експерименталните животни бяха: WBC - брой и морфология, CRP, β -2 М в урина; уринен седимент - рутинен и при оцветяване с метиленблау (наш метод), както и урокултура. Използвахме и експресни уринни тестове.

2.1. Изследване на кръв

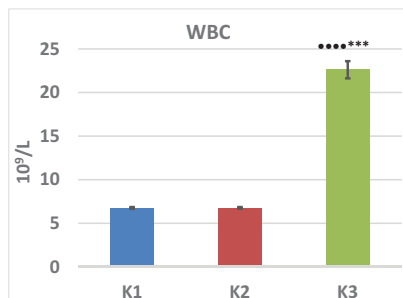
В кръвта на експерименталните животни (общ брой n=48 - сляпа контрола) са измерени броя на левкоцитите (хематологичен брояч Sysmex FS 3000) и нивото на С-реактивния протеин (CRP) (имунотурбидиметрично – Hitachi 920) преди и 24 h след инжектирането на:

- комбинираната бактериална суспензия при опитните (n=36) животни
- физиологичен разтвор при контролните (n=12) животни.
- Направена е хематологична натривка (оцветяване по Giemsa) за диференциране на левкоцитите в кръвта и откриване на токсични гранулации в тях.

2.1.1. Динамика на левкоцити (WBC) в кръвта при експериментален модел на остър (активен) ТИБН

Резултатите, представени на фигура 1 и таблица 1 показват, че броят на левкоцитите (WBC) в кръвта на експерименталните животни, преди въвеждане на бактериалната суспензия (K1; n=48) е $6.76 \pm 0.19 \times 10^9/L$ и 24 часа след инжектирането с комбинираната бактериална суспензия на опитната група животни (K3; n=36), е силно статистически значимо повишен ($p < 0.0001$) до $22.41 \pm 1.56 \times 10^9/L$. При контролната група (K2; n=12), инжектирана в същото съотношение с физиологичен разтвор, броят на левкоцитите в кръвта не търпи статистически значими отклонения от началното ниво на левкоцитите при нетретираните експериментални животни (сляпа

контрола): $6.78 \pm 0.118 \times 10^9/L$ ($p > 0.05$) (Фиг. 1., Табл. 7,8,9,10). Хематологичната натривка от кръвта на опитните животни 24 часа след третирането с комбинирания бактериален щам показва повишени нива на сегментоядрените гранулоцити, като в повечето от тях се откриват токсични гранулации.



Фиг. 1. Ефект върху нивото на WBC у мъжки Wistar плъхове при: нетретираната експериментална група; 24h след инжектирането на контролната група с физиологичен разтвор; 24h след инжектирането на опитната група с комбинирана бактериална суспензия. Използвани съкращения: K1- нулева контрола (нетретирана експериментална група n=48); K2- контролна група, третирани с физиологичен разтвор n=12; K3- опитната група животни (n=36), третирани с комбинирана бактериална култура от 24h бульонна суспензия *St. Aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml.; (Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ****- $p < 0.001$)

Табл. 1. Ефект върху нивото на WBC при: нетретираната експериментална група K1; 24h след инжектирането на контролната група K2 с физиологичен разтвор; 24h след инжектирането опитната група K3 с комбинирана бактериална суспензия, у мъжки Wistar плъхове. Третирането се прави i.v в опашната вена при животните.

	група (K1)	група (K2)	група (K3)
Средна стойност	6,7625	6,76666	22,6113
Стандартно откл.	0,1061	0,09845	0,9885
Минимум	6,57	6,66	20,85
Максимум	6,95	6,89	23,97
Брой	48	12	36

K1 - нетретирана експериментална (нулева контрола) група

K2 - контролната група животни, третирани с физиологичен разтвор

K3 - опитна група, инжектирани i.v. с бактериална суспензия от *St. aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu /ml

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

Табл. 2. Сравнение на нивото на WBC при: нетретираната експериментална (K1) група и опитната (K3) група, 24 часа след третирането ѝ с бактериална суспензия. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. Установява се съществена закономерна разлика между средните нива на WBC в кръвта на животните от двете групи; $p < 0.0001$.

	група (K1)	група (K3)
Средна стойност	6,7625	22,4113
Стандартно откл.	0,1913	1,5624
Обследвани	K1; 48	K3; 36
T статистика	-95,7787	
P(T<=t) едностранно	3,0038	
t критично едностранно	1,6882	
P(T<=t) двустранно	6,0077	
t критично двустранно	2,0280	

K1 - нетретирана експериментална (нулева контрола) група

*K3 - опитна група, инжектирани i.v. с бактериална суспензия от *St. aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml*

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

Табл. 3. Сравнение на нивото на WBC при: нетретираната експериментална (K1) група и контролната (K2) група, 24 часа след третирането ѝ с физиологичен разтвор. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. Не се установява съществена закономерна разлика между средните нива на WBC в кръвта на животните от двете групи т.е не се установяват статистически значими изменения в лабораторните параметри за WBC при K1 и K2: $p > 0.05$.

	група (K2)	група (K1)
Средна стойност	6,7766	6,7625
Стандартно откл.	0,1796	0,1913
Обследвани	K2; 12	K1; 48
T статистика	0,1289	
P(T<=t) едностранно	0,4494	
t критично едностранно	1,7340	
P(T<=t) двустранно	0,8988	
t критично двустранно	2,1009	

K1 - нетретирана експериментална (нулева контрола) група

K2 - контролната група животни, третирани с физиологичен разтвор

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

Табл. 4. Сравнение на нивото на WBC при: контролната (K2) група, 24 часа след третирането с й физиологичен разтвор и опитната (K3) група, 24 часа след третирането й с бактериална суспензия. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. Установява се съществена закономерна разлика между средните нива на WBC в кръвта на животните от двете групи; $p < 0.0001$.

	група (K2)	група (K3)
Средна стойност	6,7766	22,4113
Стандартно откл.	0,1796	1,5672
Обследвани	K2; 12	K3; 36
T статистика	-94,7687	
P(T<=t) едностранно	4,5373	
t критично едностранно	1,6870	
P(T<=t) двустранно	9,0747	
t критично двустранно	2,0261	

K2 - контролната група животни, третирани с физиологичен разтвор

*K3 - опитна група, инжектирани i.v. с бактериална суспензия от *St. aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml*

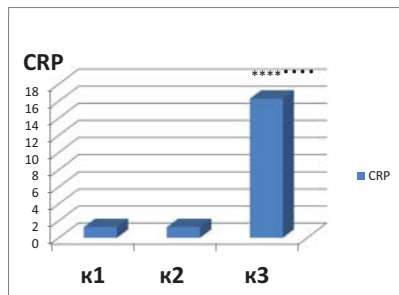
Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

В проучването се проследява ефекта от третирането на плъхове с бактериална суспензия от *St. aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml. Получените резултати (Фиг. 1., Табл. 2,3,4.) показват значително повишаване на нивото на левкоцитите в кръвта на опитните животни на 24-тия час след директната интравенозна бактериална инвазия ($p < 0.0001$), което говори за развитие на септично състояние, потвърждаващо се от наличието на токсични грануляции в сегментоядрените левкоцити на кръвта от опитните животни. Посочените данни могат да бъдат интерпретирани като белег на остър възпалителен процес, предизвикан в опитните животни.

2.1.2. Динамика на С реактивен протеин (S CRP) в кръвта при експериментален модел на активен ТИБН

Резултатите, представени на фигура 2 и таблица 5 показват, че стойностите на CRP в кръвта на експерименталните животни, преди въвеждане на бактериалната суспензия (K1; n=48) е 1.26 ± 0.036 mg/l и 24 часа след инжектирането с комбинираната бактериална суспензия на опитната група животни (K3; n=36), е силно статистически значимо повишен ($p < 0.0001$) до 16.07 ± 1.09 mg/l. При контролната група (K2; n=12), инжек-

тирана в същото съотношение с физиологичен разтвор, нивото на CRP в кръвта не търпи статистически значими отклонения от началното ниво на CRP при нетретираните експериментални животни (сляпа контрола): $1.29 \pm 0.046 \text{ mg/l}$ ($p > 0.05$).



Фиг. 2. Ефект върху нивото на CRP у мъжки Wistar плъхове при: нетретираната експериментална група; 24h след инжектирането на контролната група с физиологичен разтвор; 24h след инжектирането опитната група с комбинирана бактериална суспензия. Използвани съкращения: K1- нулева контрола (нетретирана експериментална група $n=48$); K2- контролна група, третирана с физиологичен разтвор $n=12$; K3- опитната група животни ($n=36$), третирана с комбинирана бактериална култура от 24h бульонна суспензия *St. aureus* (ATCC 25922) $1.5 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ и *E. coli* (ATCC 25923) $3.0 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$. (Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ***- $p < 0.001$)

Табл. 5. Ефект върху нивото на P CRP при: нетретираната експериментална група K1; 24h след инжектирането на контролната група K2 с физиологичен разтвор; 24h след инжектирането на опитната група K3 с комбинирана бактериална суспензия, у мъжки Wistar плъхове. Третирането се прави i.v в опасната вена при животните.

	група (K1)	група (K2)	група (K3)
Средна стойност	1,26	1,29	16,07
Стандартно откл.	0,036	0,046	1,09
Минимум	1,224	1,244	14,98
Максимум	1,296	1,336	17,16
Брой	48	12	36

K1 - нетретирана експериментална (нулева контрола) група

K2 - контролната група животни, третирана с физиологичен разтвор

K3 - опитна група, инжектирани i.v. с бактериална суспензия от Staphylococcus Aureus (ATCC 25922) $1.5 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ и E. coli (ATCC 25923) $3.0 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

Нивото на CRP в кръвта на експерименталните животни, преди въвеждане на бактериалната суспензия (K1; n=48) е $1,26 \pm 0.036$ mg/L, а 24 часа след инжектирането с комбинираната бактериална суспензия на опитната група (K3; n=36), е силно статистически значимо повишен ($p < 0.0001$) до $16,07 \pm 1.09$ mg/L. При контролната група (K2; n=12), инжектирана в същото съотношение с физиологичен разтвор, броят на левкоцитите в кръвта не търпи статистически значими отклонения от началното ниво на левкоцитите при нетретирани експериментални (сляпа контрола) животни: 1.78 ± 0.118 mg/L ($p > 0.05$).

На този етап от експерименталния модел на активен ТИБН се установява влиянието, което оказва интравенозното инжектиране на бактериална суспензия от *St. aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu /ml върху нивото на острофазовия реактант С реактивен протеин, който се явява лабораторен маркер, показващ бактериална инфекция. Получените резултати (фиг. 2) показват значително повишаване на нивото на CRP в кръвта на опитните животни на 24-тия час след директната интравенозна бактериална инвазия ($p < 0.0001$). С-реактивният протеин представлява цикличен пентамерен белтък- $\beta 2$ -глобулин с висока молекулярна маса – 140 000 Da, чиито нива в кръвната плазма нарастват в началото на острата фаза на възпалителния процес. Биологичната му функция е свързана със стимулиране на имунните реакции – той се прикрепя към бактериите и активира системата на комплемента, улеснява фагоцитозата и участва във взаимодействието на Т- и В-лимфоцитите. Синтезира се в черния дроб (или локално) в отговор на фактори, наречени цитокини, освободени от макрофагите и адипоцитите и преминава в кръвта в рамките на 2 до 6 часа от развитието на инфекцията. Нивата на С-реактивния протеин са в пряка корелация с възпалителния процес в организма. Силно статистически значимо повишените концентрации на нивата на CRP в кръвта на опитните животни 24 часа след интравенозното инжектиране на двукомпонентната бактериална суспензия може да служи като диагностичен лабораторен маркер за развитието на бактериален възпалителен процес в органите на бактериално третирани животни.

В това проучване се установява силно статистически значимо повишаване на нивото на концентрация на CRP в кръвта при опитната група животни, третирани с комбинираната микробна суспензия (**** $p < 0.0001$).

2.2. Изследване на урина

2.2.1 Динамика на нивото на β -2 М в урина при експериментален модел на активен ТИБН (U β -2М).

Нивото на β -2 микроглобулин в урината на експерименталните животни, преди въвеждане на бактериалната суспензия (К1; n=48) е $0,0904 \pm 0.055$ mg/L, а на 18-тия ден след инжектирането с комбинираната бактериална суспензия на опитната група (К3; n=21), е силно статистически значимо повишено (**** $p < 0.0001$) до $4,17 \pm 0.015$ mg/L. На 18-тия ден след инжектирането, при контролната група (К2; n=12), инжектирана в същото съотношение, както опитната, но с физиологичен, а не с бульонен микробен разтвор, β -2 микроглобулинът в урината (β -2 М) не търпи статистически значими отклонения от началното ниво на β -2 микроглобулин в урината при нетретираните експериментални животни: $0,09 \pm 0.0023$ mg/L ($p > 0.05$) (Фиг.3., Табл. 6,7.)



Фиг. 3. Ефект върху нивото на β -2 микроглобулин в урината (U β -2М) у мъжки Wistar плъхове при: нетретираната експериментална група; 24h след инжектирането на контролната група с физиологичен разтвор; 24h след инжектирането на опитната група с комбинирана бактериална суспензия. Използвани съкращения: К1- нулева контрола (нетретирана експериментална група n=48); К2- контролна група, третирани с физиологичен разтвор n=12; К3- опитната група животни (n=36), третирани с комбинирана бактериална култура от 24h бульонна суспензия *St. aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml. (Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ****- $p < 0.001$)

Табл. 6. Ефект върху нивото на U β -2М при: нетретиранията експериментална група К1; 24h след инжектирането на контролната група К2 с физиологичен разтвор; 24h след инжектирането опитната група К3 с комбинирана бактериална суспензия, у мъжки Wistar плъхове. Третирането се прави i.v в опашната вена при животните.

	група (К1)	група (К2)	група (К3)
Средна стойност	0,0904375	0,09	4,1717619
Стандартно откл.	0,00407	0,00565	0,11671002
Минимум	0,085	0,081	3,98
Максимум	0,099	0,097	4,51
Брой	К1; 48	К2; 6	К3; 21

К1 - нетретирания експериментална (нулева контрола) група

К2 - контролната група животни, третирани с физиологичен разтвор

*К3 - опитна група, инжектирани i.v. с бактериална суспензия от *St. aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml*

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

Табл. 7. Сравнение на нивото на U β -2М при: нетретиранията експериментална (К1) група и контролната (К2) група, 18 дни след третирането с й физиологичен разтвор. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. Не се установява съществена закономерна разлика между средните нива на β -2М в урината на животните от двете групи; т.е не се установяват статистически значими изменения в лабораторните параметри за U β -2М при К1 и К2: $p > 0.05$.

	група (К1)	група (К2)
Средна стойност	0,0904	0,09
Стандартно откл.	1,6591	0,0000
Обследвани	К1; 48	К2; 6
T статистика	0,1835	
P(T<=t) едностранно	0,4301	
t критично едностранно	1,9431	
P(T<=t) двустранно	0,8603	
t критично двустранно	2,4469	

К1 - нетретирания експериментална (нулева контрола) група

К2 - контролната група животни, третирани с физиологичен разтвор

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

Табл. 8. Сравнение на нивото на U β -2M при: нетретираната експериментална (K1) група и опитната (K3) група, 18 дни след третирането ѝ с бактериална суспензия. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. Установява се съществена закономерна разлика между средните нива на WBC в кръвта на животните от двете групи; **** $p < 0.0001$

	група (K1)	група (K3)
Средна стойност	0,0904	4,1719
Стандартно откл.	1,6591	0,0136
Обследвани	K1; 48	K3; 21
T статистика	-160,1267	
P(T \leq t) едностранно	7,2905	
t критично едностранно	1,7247	
P(T\leqt) двустранно	1,4581	
t критично двустранно	2,0859	

K1 - нетретирана експериментална (нулева контрола) група

*K3 - опитна група, инжектирани i.v. с бактериална суспензия от *St. aureus**

*(ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml*

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

Табл. 9. Сравнение на нивото на U β -2M при: контролната (K2) група, 18 дни след третирането с физиологичен разтвор и опитната (K3) група, 18 дни след третирането ѝ с бактериална суспензия. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. Установява се съществена закономерна разлика между средните нива на U β -2M в кръвта на животните от двете групи; **** $p < 0.0001$

	група (K2)	група (K3)
Средна стойност	0,09	4,1719
Стандартно откл.	0,0000	0,0136
Обследвани	K2; 6	K3; 21
T статистика	-159,5327	
P(T \leq t) едностранно	7,8526	
t критично едностранно	1,7247	
P(T\leqt) двустранно	1,5705	
t критично двустранно	2,0859	

K2 - контролната група животни, третирани с физиологичен разтвор

*K3 - опитна група, инжектирани i.v. с бактериална суспензия от *St. aureus**

*(ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml*

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$.

Протеинурията е основен клиничен маркер при бъбречните заболявания. Откриването на различни видове протеини в урината представлява индикатор за локализация на бъбречната патология. Анализът ѝ предлага нетравмиращо бъбрека наблюдение на неговото състояние за ранно откриване на развиваща се в различни отдели на неговите структури патология. С оглед на хистопатологичната токсичност, която протеинурията оказва върху бъбрека е задължително нейното внимателно проследяване и изясняване на етиологията ѝ.

Когато протеинурията е от бъбречен произход, патологията е локализирана в различни части на нефрона. Естеството на този тип протеинурия е свързано с патологична трансгломерулна филтрация, позволяваща преминаването на протеини с висока молекулна маса (HMW) и (или) патологична реабсорбция от епителните клетки на проксималните тубули, водеща до откриване в окончателната урина на някои протеини с ниска молекулна маса (LMW).

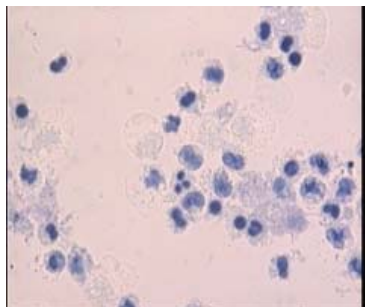
β 2- Микроглобулинът има мол. маса 11,58 kDa- т.е физиологично се филтрира на 100%, но тъй като е необходим на организма, той генетически е изработил механизми за 99,9% реабсорбцията му на нивото на бъбречните тубули. Поради това, откриването на β -2M в урината е маркер за нарушение в тубулната реабсорбция – тубулопатия.

В това проучване се установява силно статистически значимо повишаване на нивото на концентрация на β 2- M в урината при опитната група животни, в сравнение с нетретираниите експериментални (сляпа контрола) и контролната група, третирана с физиологичен разтвор (**** $p < 0.0001$) (Табл. 8 и 9).

2.2.2. Левкоцитни субпопулации в уринен седимент при активен ТИБН.

Използване на наш цитохимичен метод за откриване на морфологични форми на активни левкоцити (glitter cells) в седимент на урина

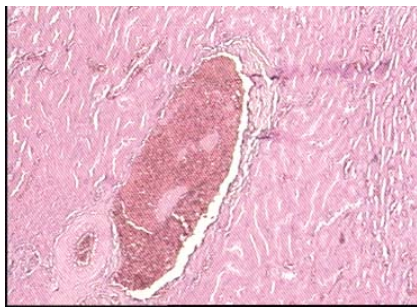
В урината на опитните животни, третирани с микробната бульонна суспензия, която е изследвана между 14-тия и 18-тия ден, паралелно с бактериурията се наблюдава левкоцитурия. Откриват се два вида левкоцити: едните се оцветяват по-интензивно, като сегментите в ядрата им се очертават видимо добре. Вторият вид левкоцити в изследвания уринен седимент се багрят слабо с methylenblau, а под фазов контраст в цитопазмата им се установяват хаотично движещи се частици (брауново движение), картина, характерна за т. нар. активни, живи левкоцити (блестящи клетки, glitter cells) (Фиг. 4.).



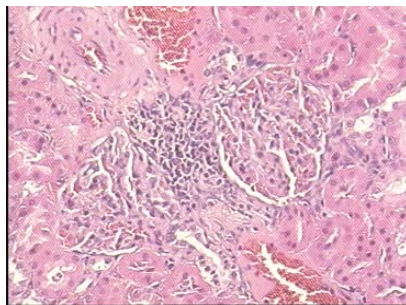
Фиг. 4. Активни левкоцити (блестящи клетки). Оцветяване с 1% methylenblau (наш метод), увеличение 10 x 100.

2.2.3. Хистоморфологична картина на активен ТИБН при опитните животни

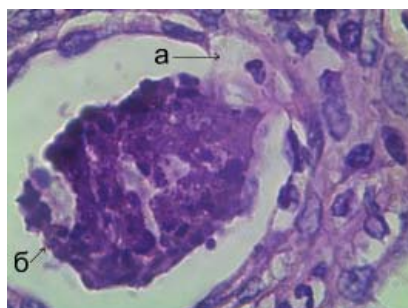
На 14, 16 и 18-тия ден след инжектирането с бульонна бактериална суспензия на *St. aureus* (ATCC 25922) 1.5×10^6 cfu/ml и *E. coli* (ATCC 25923) 3.0×10^6 cfu/ml, след наркоза с диетилов етер, са декапитирани по 2 животни от контролната група и от опитната група. Бъбреците са фиксирани в 10% неутрално буфериран формалин, след което са поставени в парафин, нарязани върху микроскопски стъкла и оцветени с hematoxylin-eosin (*H & E*). Направено е светлинно-микроскопско хистопатологичното изследване (микроскоп Zeiss) и резултатите са документирани с микрофотокамера Olympus (Фиг. 5.6.7).



Фиг. 5. Еритроцитна стаза в интерлобуларно разклонение на венозен съд в паренхима на бъбрека на 14-тия ден след микробното инжектиране. Оцветяване H & E, увеличение 10 x 40



Фиг. 6. Левкоцитни инфилтрати в интерстициалната тъкан, около бъбречните каналчета, гломерули и стените на съдовете на 16-тия ден след микробното инжектиране. Оцветяване Н & Е, увеличение 10 х40.



Фиг. 7. Бъбречно каналче, 18-ти ден след микробното инжектиране на опитната група животни: (а) - дегенеративни промени в епитела на стената на бъбречното каналче; (б) - възпалителна клетъчна инфилтрация в лумена на бъбречното каналче със струпване на сегментоядрени левкоцити и бактерии. (Оцветяване Н & Е, увеличение 10 х 100.)

3. Допълнение към алгоритъма за клинично лабораторни изследвания при активен тубуло-интерстициален бактериален нефрит (остър или обострен пиелонефрит)

3.1. Апробиране на някои лабораторни уропротеинни маркери при прилагане на европейските насоки за уринен анализ при референтна група здрави лица при наши условия

Протеинурията /наличие на повече от 150 до максимум 300 mg белтък в 24 часова урина/ е един от основните симптоми на бъбречните заболявания. До посочената граница тя е физиологична – представлява количеството филтриран белтък през гломерулните капиляри, което не е реабсорбирано в проксималните извити каналчета. При тубуло-интерстициални заболявания се увреждат епителните тубулни клетки, при което се нарушава реабсорбцията на филтрираните белтъци и те се отделят с урината. Тубулната протеинурия е селективна – откриват се главно нискомолекулярни белтъци (α_1 - и β_2 - микроглобулин). Определянето на креатинин в урина се използва за оценка на екскреционната скорост на уринни съставки чрез изчисляване на концентрационното им отношение спрямо креатинина. За същата цел може да се ползва и mOsm в урина. Така се компенсират вариациите във воднта екскреция и протеинурията се обективизира чрез бъбречната филтрация. Количественото определяне на протеинурията може да се представи чрез различни дименсии: g протеин или протеинови фракции, отнесен към литър - L урина, към 24 часова уринна порция, към концентрацията на креатинина в урината, изразена в грам креатинин - g Cr, мол креатинин - mol Cr, към осмоларитета на урината в mOsm.

За да се ползваме от точната информация, която можем да получим от анализа на уропротеини, е задължително да познаваме:

- правилата за анализ на протеини в урината
- начините за представяне на резултатите, както и
- границите на тези параметри при здрави лица

За целта сформирахме референтна група от 130 здрави лица на възраст между 20 и 65 години, отговарящи на всички изисквания на IFCC, подбрани на директен принцип - пол, възраст, анамнеза и статус- клинично здрави, без фамилни заболявания, трикратното измерване на кръвното им налягане е в границите на нормата, не съобщават за диабет-стойностите

на измерената им кръвна захар е в референтната област с нормални нива на креатинин и урея в кръвта, не съобщават за бъбречни заболявания и уринните тесове не показват наличие на WBC, Erys, бактерии и +белтък, в момента не вземат никакви лекарства, не злоупотребяват с алкохол и упойващи вещества, жените не са бременни и не кърмят, не вземат контрацептиви, не са в мензис, лицата нямат прекомерно физическо натоварване, не работят при вредни условия на труд или при прекомерен стрес.

Проследените лабораторни параметри са: общо ниво на протеини в урина, микроалбумин, β -2 М, осмоларитет и креатинин в първа порция сутришна урина, както и отношението на посочените протеини към екскреционното креатининово ниво и уринния осмоларитет.

Спазвайки европейските препоръки (EG) за уринен анализ, изследвахме първа порция сутрешна урина с рН между 6 и 8, изследвана до 1,5 - 2 часа след отделянето ѝ. Уринният анализ включваше:

- общ протеин (U протеин- турбидиметрия - Hitachi 902, Olympus 400),
- албумин (U микроалбумин - имунотурбидиметрия - Hitachi 902, Olympus 400),
- β -2 микроглобулин (U β -2 М - имунотурбидиметрия -Hitachi 902, Olimpus 400);
- креатинин (U креатинин Jaffe кинетично - колориметричен с пикринова киселина - Hitachi 902, Olympus 400);
- U осмоларитет: криоскопия - осмометър на Knauer

Събирането на диуреза крие рискове от неточности в изпълнението си, които могат да бъдат свързани с неточен обем на събираната урина, неправилно съхранение /температура, консервант/. Разрушаването на наличните в урината клетки при възпалителния процес, което се получава при престояването ѝ в рамките на 24 часа, може да интерферира върху нивото на протеинурията. Това компроментира дименсията „U протеин /на 24 часа урина“. От друга страна количеството на екскретирания протеин в различните порции урина търпи физиологични различия, което компроментира дименсията „U протеин/ L урина“. Обвързването на U протеин с величината на бъбречната филтрация представя по най-реален начин количествената характеристика на отделените с урината протеини. Това може да се направи чрез отнасянето на протеина или фракциите му към уринния креатинин - U Cr.

По този начин протеинурията, като обща или фракционирана може да бъде представена много по-обективно и независимо от интерфериращи условности. Осмоларитет е концентрацията на разтворените в течността / урината / частици. Той се отнася до броя на осмоли на литър течност -“an

osmole“ (съкратено Osm) т.е. „на парче“ на молекула. Към това трябва да се прибавят още и отделените осмотичноактивни крайни продукти на белтъчната обмяна и патологично попаднали осмотично-активни въгледихидратни продукти.

U Osm - 855 – 1355 mOsm /L

Тази голяма амплитуда дава възможност на бъбрека ежелементно и извънредно прецизно да балансира хомеостазата на организма. Затова отнасянето на който и да е продукт, отделен в даден момент през бъбрека, към стойностите на бъбречния осмоларитет, измерен в единична порция урина, правят определянето на неговата концентрация много прецизно и обективно. Това многократно повишава сензитивността, а от там и възможността на това съотношение да се явява много ранен маркер за патологията като цяло и в частност на бъбрека.

Получените резултати представихме в следните дименсии (Табл. 10,11,12.):

- отношение белтък и неговите фракции албумин и β -2 М / към креатинин и осмоларитет в урина:
- U protein g/L (U p g/L), U protein g/mol Cr, U protein g/g Cr, U protein g/mOsm,
- U albumin mg/L (U alb mg/L), U albumin mg/mol Cr, U albumin mg/g Cr, U albumin mg/mOsm,
- U β -2 М mg/L, U β -2 М mg/mol Cr, U β -2 М mg/g Cr, U β -2 М mg/mOsm.

Табл. 10. Лабораторни резултати на общи протеини в урината (U p) на референтната група, представени според Европейските препоръки.

№	Лабораторен параметър	Средна аритметична	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)
1	U p g/L	0.1108	0.04819	0.1024 ÷ 0,1191
2	U p g/mol Cr	9.7787	3.84456	9.1116 ÷ 10.4459
3	U p g/g Cr	0.855218	0.3210315	0.799510 ÷ 0.910926
4	U p g/mOsm	0.00015779	0.000097158	0.00014093 ÷ 0.00017465

Табл. 11. Лабораторни резултати на албумин в урината (микроалбумин; U alb) на референтната група, представени според Европейските препоръки .

№	Лабораторен параметър	Средна аритметична	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)
1	U alb mg/L	16.4923	21.60220	12.7437 ÷ 20.2409
2	U alb mg/mol Cr	1248.6400	1242.70782	1032.9953 ÷ 1464.2847
3	U alb mg/g Cr	13.0756	17.76570	9.9928 ÷ 16.1585
4	U alb mg/mOsm	0.02309621	0.029307670	0.01801050 ÷ 0.02818191

Табл. 12. Лабораторни резултати на β -2 микроглобулин в урината (U β -2 M) на референтната група, представени според Европейските препоръки .

№	Лабораторен параметър	Средна аритметична	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)
1	U β -2 M mg/L	0.1198	0.04752	0.1115 ÷ 0.1280
2	U β -2 M mg/mol Cr	11.0745	5.43892	10.1307 ÷ 12.0183
3	U β -2 M mg/g Cr	0.09809	0.074745	0.08512 ÷ 0.11106
4	U β -2 M mg/mOsm	0.00015521	0.000082290	0.00014093 ÷ 0.00016949

Изработихме корелационна зависимост на лабораторните параметри за протеинурия на референтната група лица и възрастта. Това ни даде възможност да направим нашия извод, че не се установяват статистически значими изменения в лабораторните параметри за протеинурия на референтната група лица с нарастване на възрастта ($p > 0.05$), с изключение на U β -2 M mg/L и U β -2 M mg/mol Cr, при които има статистически значима умерена права корелация (** $p < 0.05$) (Табл. 13,14,15.).

Табл. 13. Корелационни зависимости на лабораторния параметър U protein в представяното му според EG за протеинурия на референтната група лица и възрастта (n = 130)

№	Лабораторен параметър	r	p
1	U protein g/L	-0.022	0.805
2	U protein g/mol Cr	0.052	0.560
3	U protein g/g Cr	0.079	0.370
4	U protein g/mOsm	0.025	0.782

Табл. 14. Корелационни зависимости на лабораторния параметър U albumin (микроалбумин) в представянето му според EG за протеинурия на референтната група лица и възрастта (n = 130)

№	Лабораторен параметър	r	p
1	U albumin mg/L	-0.071	0.422
2	U albumin mg/mol Cr	0.036	0.683
3	U albumin mg/g Cr	-0.052	0.554
4	U albumin mg/mOsm	-0.086	0.331

Табл. 15. Корелационни зависимости на лабораторния параметър U β-2 M в представянето му според EG за протеинурия на референтната група лица и възрастта (n = 130)

№	Лабораторен параметър	r	p
1	U β-2 M mg/L	0.434	0.000
2	U β-2 M mg/mol Cr	0.525	0.000
3	U β-2 M mg/g Cr	0.054	0.538
4	U β-2 M mg/mOsm	0.088	0.318

Определихме зависимостта на лабораторните параметри за протеинурия (общи протеини и някои протеинови фракции) на референтната група лица и пола.

Табл. 16. Корелационни зависимости на лабораторните параметри за U protein на референтната група лица и пола (референтна група n = 130; мъже: n = 72; жени: n = 58).

№	Лабораторен параметър	Средна стойност	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)	p	
1	U protein g/L	мъже	0.1086	0.04122	0.0989 ÷ 0.1183	0,231
		жени	0.1134	0.05590		
2	U protein g/mol Cr	мъже	9.9025	3.84923	8.989 ÷ 10.8071	0,493
		жени	9.6250	3.86674		
3	U protein g/g Cr	мъже	88.6623	32.16145	81.9980 ÷ 96.2199	0,584
		жени	81.6233	31.87638		
4	U protein g/mOsm	мъже	0.000155	0.00008548	0.0001350 ÷ 0.00017	0,186
		жени	0.000160	0.000108648		

Ние не откриваме статистически значими изменения в лабораторните параметри за U protein на референтната група лица по отношение на пола ($p>0.05$) (Табл. 16.).

Табл. 17. Корелационни зависимости на лабораторните параметри за U albumin на референтната група лица и пола (n = 130; мъже: n = 72; жени: n = 58).

№	Лабораторен параметър	Средна стойност	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)	p
1	U albumin mg/L мъже жени	13,9583 19,6379	11.91098 29,34651	11,1594-16,7573 11,9217-27,3542	0,137
2	U albumin mg/mol Cr мъже жени	1206,693 1300,711	1130,55293 1377,67310	941,0268-1472,3606 938,4705-1662,9519	0,670
3	U albumin mg/g Cr мъже жени	12,45881 13,8414	12,97681 22,43796	9,4093-15,5082 7,9416-19,7411	0,670
4	U albumin mg/mOsm мъже жени	0,019459 0,027611	0,016000691 0,039844158	0,01569906-0,02321902 0,01713482-0,03808780	0,115

Не се откриват статистически значими изменения в лабораторните параметри за микроалбуминурия на референтната група лица по отношение на пола ($p>0.05$) (Табл. 17.).

Табл. 18. Корелационни зависимости на лабораторните параметри за U B-2 M на референтната група лица и пола (n = 130; мъже: n = 72; жени: n = 58).

№	Лабораторен параметър	Средна стойност	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)	p
1	U B-2 M mg/L мъже жени	0,1221 0,1169	0,04485 0,05089	0,1115-0,1326 0,1035-0,1303	0,538
2	U B-2 M mg/mol Cr мъже жени	11,1144 11,0249	5,14679 5,82650	9,9050-12,3239 9,4929-12,5569	0,926
3	U B-2 M mg/g Cr мъже жени	0,10597 0,08831	0,092626 0,042201	0,08421-0,12774 0,07721-0,09941	0,182
4	U B-2 M mg/mOsm мъже жени	0,000155 0,000154	0,000078886 0,000087024	0,00013721-0,00017429 0,00013165-0,00017742	0,934

Не се откриват статистически значими изменения в лабораторните параметри за U B-2 M на референтната група лица по отношение на пола ($p>0.05$) (Табл. 18.).

Ползвахме само първа порция сутришна урина с pH между 6-8.

Сравнихме получените в нашата референтна група резултати с обявените референтни граници при такова представяне. Получените в нашата референтна група стойности на протеинурията са както следва:

- общи протеини в урината /U p/:
 - U p g/L = $0.1024 \div 0.1191$ при обявени от 0 до 0.150 g/L
 - U p g/mol Cr = $9.1116 \div 10.4459$ при обявени до 25 g/mol Cr
 - U p g/g Cr = $0.799510 \div 0.910926$ при обявени до 0.2 g/g Cr
 - U p g/mOsm = $0.00014093 \div 0.00027465$ при обявени до 0.000375 g/mOsm
- албумини в урината /U alb /
 - U alb mg/L = $12,74 \div 20,2409$ при обявени до 30 mg/L
 - U alb mg/mol Cr = $1032,9953 \div 1464,2847$ при обявени 1578,90 mg/mol Cr
 - U alb mg/g Cr = $9.9928 \div 16.1585$ при обявени до 25 mg/g Cr
 - U alb mg/mOsm = $0,01801 \div 0,02818$ при обявени до 0,075 mg/mOsm
- β -2-микроглобулин в урината /U β -2 M/
 - U β -2 M mg /L = $0.1115 \div 0.1280$ при обявени до 300 ng/ml
 - U β -2 M mg /mol Cr = $10.1307 \div 12.0183$ при обявени до 30 mg /mol Cr
 - U β -2 M mg/g Cr = $0.08512 \div 0.11106$ при обявени от 0 до 300 μ g/g Cr
 - U β -2 M mg/mOsm = $0.00014093 \div 0.00016949$ при обявени до 0,000714 mg/mOsm

3.2. Уропротеинни лабораторни маркери при пациенти с клинично доказан активен ТИБН - диагностична ефективност

При групата пациенти бе изследвана диагностичната ефективност на албумин в урина (микроалбуминурия) и β -2 M в урина при активен тубуло - интерстициален бактериален нефрит, оценена с Receiver Operating Characteristic /ROC/ анализ на SPSS- статистическа интерпретация.

Терминът Receiver Operating Characteristic -ROC curve или по-популярен като „Работна характеристика“ или ROC - крива се въвежда при проверка на даден експериментален модел. ROC - кривата описва зависимостта на параметрите сензитивност и специфичност. Колкото по-точно дескриминиращ е теста, толкова по-стръмна е възходящата част на кривата и толкова по-голяма е площта под нея. Върхът на кривата маркира оптималната прагова стойност за конкретния тест. Степента, до която инструментът (ROC - curve) различава целевите групи (в рамките на това изследване групата на пациенти с клинично доказан активен ТИБН и групата от здрави лица), се определя на базата на отдалечеността на работната характеристика от диагонала на площта на графиката. Колкото кривата е по-близо до горния ляв ъгъл, толкова даденият тест има по-висока диагностична стойност, т.е

завишените му стойности могат да се прибавят в алгоритъма на клиничната диагностика на съответното заболяване, което определя тежестта на диагностична му ефективност. Мярка за отдалечеността на групата на болните и тази на здравите по отношение на изследвания параметър се явява представената площта под ROC - кривата („Area under the curve“ - AUC) или „Плош под кривата“ (ППК). Площта под ROC - кривата има смисъл на относителен дял или процент, който бележи различимостта на двете изследвани групи по отношение на изследвания субстрат. При неспособност на даден субстрат (лабораторен параметър) да различава изследваните групи (здравни- болни), ППК = 0,5. Съответно при нарастване на различителните способности на субстрата ППК се приближава към единица. Следователно индексът на „Area under the curve“ варира от 0,5 до 1.

Всяка една от точките на ROC кривата се характеризира с две величини, съответно по абсцисата и по ординатата, показващи данните за сензитивност и специфичност на теста в определен момент /Sensitivity и 1 - Specificity/. Това дава информация за степента на реалната значимост на лабораторния параметър в диагностиката на определено заболяване при изследвания пациент.

При определянето на ROC крива за даден параметър винаги се явяват една или две двоични системи /точки от кривата/, при които изискването за най-голяма сила на сензитивност и специфичност на теста, е изпълнено едновременно. Тези точки условно се означават с термина „cutoff value“- „изключваща стойност“.

3.2.1. Диагностична ефективност на U albumin (микроалбуминурия) при диагностиката на активния ТИБН

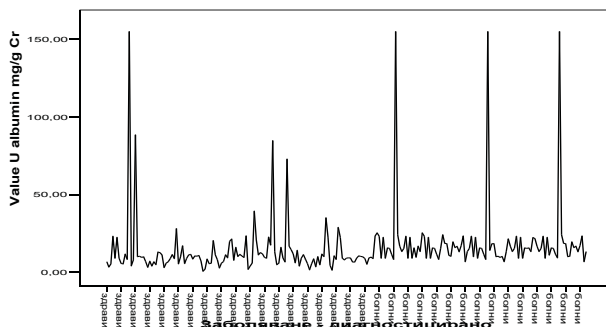
Табл. 19. Лабораторни стойности на анализирания параметър U albumin mg/g Cr (n=105- мъже 57 (67.6%); жени 48 (32.4%) при болни с клинично доказан активен (остър или обострен) тубуло - интерстициален бактериален нефрит (аТИБН).

U albumin mg/g Cr	Средна стойност	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)	Полова разлика (p, t-test)
Общо (n=105)	22,123	30,2854	8,695:35,551	
Мъже (n=57)	15,232	6,9455		0,527
Жени (n=48)	24,707	35,2404		

Няма статистически значима разлика между средните стойности на U albumin mg/g Cr по пол (p=0,527; $p > 0.05$) (Табл. 19.).

Табл. 20. Сравнение на средно-аритметичните величини на лабораторния параметър U albumin mg/g Cr на болните с клинично доказан активен ТИБН (n = 105) и здравите (n = 130) лица. Сравняване на средните стойности на U albumin mg/g Cr на болните с активен ТИБН (n=105) и здравите (n=130): ср. аритм. на здравите 13,0756; ср. аритм. на болните 18,727; t=1,95; p>0.05; (t-критерий на Student)

параметър	ср. аритм. на здравите (n = 130)	ср. аритм. на болните (n = 105)	t-критерий на Student
U albumin mg/g Cr	13,0756	18,727	t=1,95



Фиг. 8. Графично представяне на стойностите на U albumin (mg/g Cr) на болните (n = 105) и здравите (n = 130):

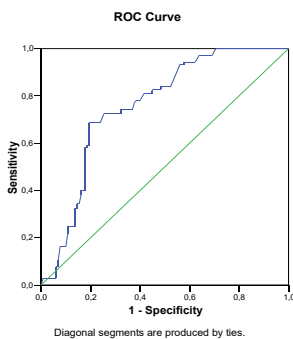
Няма статистически значима разлика между средните стойности на болните и здравите (на болните е по-висока, но разликата не е статистически значима. Средната аритметична на здравите е 13,0756; средната аритметична на болните е 18,727; t = 1,95; p<0.05 (t-критерий на Student)-граничната стойност на t-критерия за значимост p<0.05, като е 1,96, а тук стойността t=1,95 - близко, но недостатъчно за значимост на резултата).

От таблица 19 и таблица 20 следва изводът, че не е задължително при отсъствие на активен тубуло-интерстициален бактериален нефрит да отсъства микроалбинурия, както и не е задължително при активния тубуло-интерстициален бактериален нефрит нивата на микроалбинурията да са високи, което личи и от фигура 8.

Табл. 21. Стойности на площта под ROC кривата (ППК = 0.758) за теста U albumin (mg/g Cr) при активен ТИБН (ОПН и ХОПН).

ППК	Стандартна грешка	Асимптомни	95% доверителен интервал - долна граница	95% доверителен интервал - горна граница
.758	.032	0.00	.696	.820

Таблица 21 показва, че ППК = (0.758), т.е. тестът *U albumin* (mg/g Cr) при активен ТИБН (ОПН и ХОПН) има “задоволителна” диагностична надеждност



Фиг. 9. ROC кривата на тестът U albumin mg/g Cr при ОПН и ХОПН

Площта под ROC кривата (0.758) показва, че тестът U albumin mg/g Cr при ОПН и ХОПН има “задоволителна” диагностична надеждност по класификацията (Фиг. 9.):

- 90 - 100 = excellent (A) - отлична диагностична надеждност;
- 80 - 90 = good (B) - добра диагностична надеждност;
- 70 - 80 = fair (C) - сравнително добра диагностична надеждност;
- 60 - 70 = poor (D) - задоволителна диагностична надеждност;
- 50 - 60 = fail (F) - незадоволителна диагностична надеждност.

Табл. 22. Точки на чувствителност и специфичност на „Работна характеристика“ (ROC) за величината U albumin mg/g Cr

Положителен, ако е >или = на	Чувствителност	1 – Специфичност
.3200	1.000	1.000
1.0300	1.000	.992
6.8900	.971	.692
7.0350	.971	.685
7.2400	.971	.677
7.5650	.971	.669
7.6523	.970	.665
7.6941	.968	.661

В зависимост от предназначението на теста – за скрининг или за диагностика, в случая критичната точка (cut-off - разграничителна, прагова стойност, ниво, критерий за вземане на решения) е вероятно една от двете (Табл. 22,23.).

Табл. 23. Критични точки на тестът U albumin mg/g Cr при ОПН и ХОПН

Чувствителност	1 – Специфичност
.971	.692
.971	.685

3.2.2. Диагностична ефективност на U β-2 М при диагностиката на активния ТИБН

Табл. 24. Лабораторни стойности на анализирания параметър β-2 М в урина при пациенти с клинично доказан активен (остър или обострен) тубуло интерстициален бактериален нефрит (параметър - U β-2 М mg/L (n=105); мъже 57 (67.6%); жени 48 (32.4%))

U β-2 М mg/L	Средна стойност	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)	Полова разлика (p, t-test)
Общо (n=105)	1.3312	0.87841	1.186 ÷ 1.5438	0.987
Мъже (n=57)	1.3300	0.89233		
Жени (n=48)	1.3336	0.86922		

Няма статистически значима разлика между средните стойности на U β -2 M mg/L по пол ($p = 0.987$) т. е. ($p > 0.05$) (Табл. 24.).

Табл. 25. Стойности на U β -2 M mg/L, отнесени към възрастта на болните в изследваната група пациенти с клинично доказан активен ТИБН

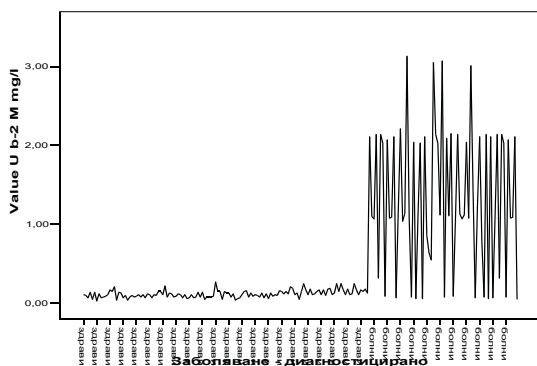
U β -2 M mg/L	Средна стойност	Стандартно отклонение	Доверителен интервал (CI, 95%)	Възрастова разлика (p)	Възрастова разлика (r)
n = 105)	1.3312	0.87841	1.186 ÷ 1.5438	0.776	0.035

Отнасянето на U β -2 M mg/L към възрастта на болните в изследваната група установява, че няма статистически значима зависимост между възрастта и стойностите на U β -2 M mg/L- $r = 0.035$; $p = 0.776$ ($p > 0.05$) (Табл. 25.).

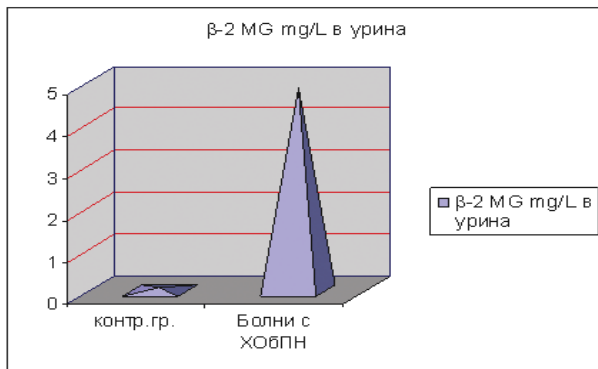
Увеличението на новото на β -2 M в урината при болни с аТИБН е значително, което се вижда от таблица 26, фигури 10 и 11.

Табл. 26. Сравнение на средно-аритметичните величини на лабораторния параметър U β -2 M mg/L на болните с клинично доказан активен ТИБН (n = 105) и здравите (n = 130) лица .

параметър	ср. аритм. на здравите (n = 130)	ср. аритм. на болните (n = 105)	t-критерий на Student
U β -2 M mg/L	0.1198	1.3312	12.1



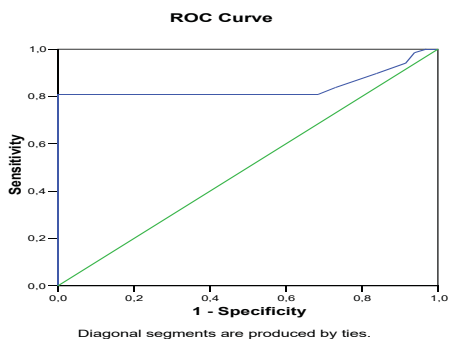
Фиг. 10. Средни стойности на U β -2 M mg/L на болните (n = 105) и здравите (n = 130): ср. аритм. на здравите 0.1198; ср. аритм. на болните 1.3312; $t = 12.1$; $***p < 0.001$ (t-критерий на Student)



Фиг. 11. Разлика между средните стойности на болните и здравите (при болните стойностите на U β -2 M mg/L имат силно статистически значимо- повишени резултати - *** $p < 0.001$).

Табл. 27. Стойности на площта под ROC кривата (ППК= **0.839**) за теста U β -2 M mg/l при активен ТИБН (ОПН и ХОПН).

ППК	Стандартна грешка	Асимптомни	95% доверителен интервал долна граница	95% доверителен интервал горна граница
.839	.041	0.00	.760	.919



Фиг. 12. ROC- крива на U β -2 M mg/L (група болни с клинично доказан активен ТИБН, група здрави лица).

Таблица 27 показва, че ППК = **(0.839)**, т.е. тестът U b-2 М mg/l (*при активен*: остър и хронично обострен пиелонефрит - ОПН и ХОПН) има “добра” диагностична надеждност.

Площта под ROC- кривата (Фиг. 12) ППК= 0.839 показва, че тестът U b-2 М mg/l (*при активен*: остър и хронично обострен пиелонефрит - ОПН и ХОПН) има “добра” диагностична надеждност по класификацията:

- 90 - 100 = excellent (A) - отлична диагностична надеждност
- 80 - 90 = good (B) - добра диагностична надеждност
- 70 - 80 = fair (C) - сравнително добра диагностична надеждност
- 60 - 70 = poor (D) - задоволителна диагностична надеждност
- 50 - 60 = fail (F) - незадоволителна диагностична надеждност

Табл. 28. Точки на чувствителност и специфичност на „Работна характеристика“ (ROC) за величината U b-2 М mg/l.

Положителен, ако е >или = на	Чувствителност	1 – Специфичност
.9700	1.000	1.000
.0350	1.000	.992
.0450	1.000	.969
.0550	.985	.938
.0650	.941	.915
.0750	.897	.838
.0850	.838	.731
.0950	.809	.685

Табл. 29. Разграничителна стойност на U b-2 М mg/l при активен ТИБН.

Чувствителност	1 – Специфичност
.985	.938
.941	.915

В зависимост от предназначението на теста – за скрининг или за диагностика, в случая критичната точка (cut-off - разграничителна, прагова стойност, ниво, критерий за вземане на решения) е вероятно една от двете посочени по-горе (Табл. 28,29.).

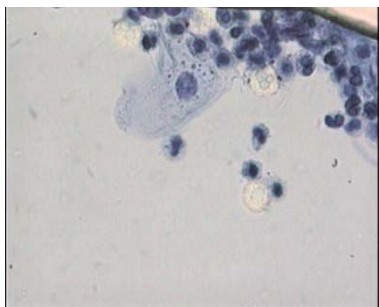
Данните от Работната характеристика (ROC) убедително говорят, че лабораторният параметър U b-2 М може да се добави в лабораторния панел за диагностика на активен ТИБН.

3.3. Изработване на бърз и надежден цитохимичен метод за откриване на активни левкоцити (glitter cells) в уринен седимент при пациенти с клинично доказан активен ТИБН и сравнение визуализацията на два метода.

Предложеният от нас метод представлява суправитално оцветяване с 1% р-р на methylenblau, при което материал (седимент) и оцветител се поставят в равни съотношения, размесват се и се оставят във влажна камера за 3 - 5 min, след което една капка се поставя върху предметно стъкло и се притиска с покривно.

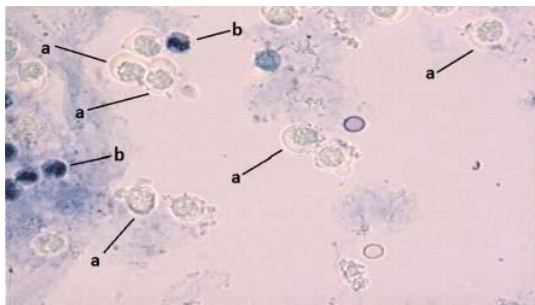
Гледа се на различни увеличения (препоръчително 10 x 100). При тази методика не е необходимо ползването на фазовоконтрастен микроскоп.

С помощтта на нашата методика се установяват два вида неутрофилни, сегментоядрени левкоцити в уринния седимент на пациенти с клинично доказан активен ТИБН – едните (а) са с обичайните размери и форма, слабо различимо ядро и груба зърнистост в протоплазмата.



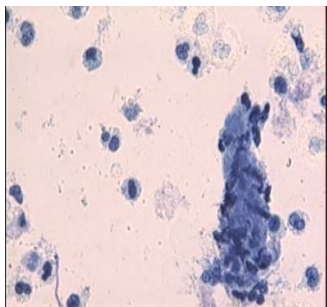
Фиг. 13. Оцветяване с 1% methylenblau, увеличение 10 x 100. / документиран с микрофотокамера Olympus/

Левкоцитите от втората група (б) са с увеличени размери (1.5 – 2 пъти по-големи от нормалните), с кръгла форма, понякога с вакуолизация на протоплазмата. Ядрото на тези левкоцити е полисигментирано, разделено на 2 до 4 сферични, свързани помежду си части и е по-тъмно оцветено в сравнение с тяхната протоплазма. В цитоплазмата им се наблюдават грануляции, които се намират в състояние на непрекъснато хаотично (брауново) движение (Фиг. 13,14.).



Фиг. 14. Оцветяване с 1% methylenblau, увеличение 10x 100 / документирана с микрофотокамера Olympus /

Левкоцитите от втората група е прието да бъдат наричани клетки на Sternheimer-Malbin. Фактът, че при болни с остър пиелонефрит тези клетки се откриват почти винаги говори, че те биха могли да се прибавят към лабораторната констелация за диагностициране на активен ТИБН (активен пиелонефрит). Установено е, че в процеса на стареене или при смърт на клетката, способността на левкоцитите да възприемат различни бои (цитохимични методи за диагностика) расте, а обемът им и подвижността на гранулите в цитоплазмата – намаляват (Фиг. 15.).



Фиг. 15. Оцветяване с 1% methylenblau, увеличение 10 x 100. Документирана с микрофотокамера Olympus.

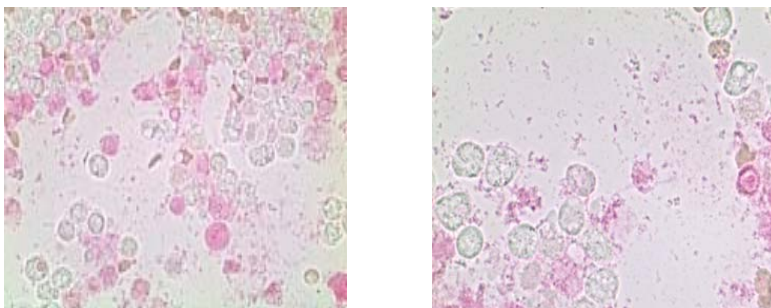
Бледо оцветените левкоцити с брауново движение на гранулациите в цитоплазмата са млади, т. нар. живи, активни левкоцити (glitter crlls), а тъмно оцветените - т. нар. стари или мъртви левкоцити.

Направихме по изработения от нас метод оцветяване с *Eosin Yellow*.

Сравнихме образите с двете оцветявания.

С този вид оцветяване (Фиг. 16.), по изработената от нас методика ус-

тановихме, че в седимента на урината, също се визуализират два вида сегментоядрени левкоцити.



Фиг. 16. Оцветяване с Eosin Yellow /2 типа левкоцити/, увеличение 10x 100 /документирани с микрофотокамера Olympus/

Позовавайки се на нашата методика, ползвахме принципа на този метод за доказване на витални левкоцити в уринен седимент. Сравнихме образите с двете оцветявания.

Микроскопското изследване на уринен седимент, за съжаление, в практиката често се извършва не по стандартните правила ([medstandard.htm № 1 /31.01.2014 -BG; Casper DJ et al., 2016](#)). Предложеният от нас лесен, бърз и евтин метод за визуализиране на левкоцитите в урината (D. Paskalev, S. Tancheva, 2007) ни дава възможност за бърза ориентация в проблема с инфекции на пикочо-отделителната система.

Идеалното представяне на прецизна морфологична картина на седимента на урината може да бъде постигнато с използването на фазово-контрастен микроскоп (Sultana T et al., 2011). Възможността за ползване на такъв вид микроскопи, обаче, е скъпа, изисквава специална подготовка и поради тази причина е ограничена. Стандартно микроскопиране се прави с помощта на обикновен светлинен микроскоп (Scand. J. Clin. Lab, 2000) на нативен, неочетен седимент, получен при стандартни условия (Wiersma TJ, Timmermans AE et al., (first revision) 2001) и наблюдаван на различно увеличение (Fogazzi G. B., Garigali G., Pirovano B. et al., 2007).

Багрилото methylenblau е едно от най-безвредните за органичната материя багрила (Richard C. Dart et al., 2004) Още през 19-ти век Paul Ehrlich го ползва за селективна хистоморфология (Bosch F, Rosish L, 2008).

Днес то търпи ренесанс (Masato Hosokawa, Tetsuaki Arai et al., 2012)

Използвайки това багрило за оцветяване на уринен седимент по начина, по който ние решихме да правим това, установихме ясната картина на

два типа гранулоцитни левкоцити, описани още от *Sterncheimer-Malbin* (Sterncheimer R, 1975).

Оцветяването с EosinYellou е утвърден от СЗО метод (Burgos MH et al., 1951) за доказване на витални сперматозоиди. Всички подвижни сперматозоиди, понеже са живи, остават безцветни, а мъртвите се оцветяват с EosinY в розово. Една част от неподвижните сперматозоиди се оцветяват, а друга не. От гореизложеното се вижда, че методът на оцветяване с EosinYellou се използва за диференциране на неподвижните живи от неподвижните мъртви сперматозоиди (Eliasson R et al. 1977). Живите неподвижни сперматозоиди остават безцветни. Така методът се ползва за представяне на виталитет на сперматозоидите. Ние, позовавайки се на нашата методика ползвахме принципа на този метод за доказване на витални левкоцити в уринен седимент. Сравнихме образите с двете оцветявания.

Така потвърдихме предположението, че гранулоцитите от втори тип са живи /витални / левкоцити. Предложеният от нас метод за морфологично диференциране на левкоцитите в уринния седимент показва много добри резултати, които ни навеждат на мисълта, че нашият метод представя виталитета на клетки / култури / и като такъв той би могъл да се ползва в различни области на медицината, където има необходимост от дефиниране виталитета на клетките.

Оцветяването на мъртвите клетки се дължи на факта, че мембраните им неселективно пропускат багрилото (Bubendorf L, Vasei M et al., 2006). Ние обясняваме оцветяването на мъртвите клетки с това, че клетъчната им мембрана губи своята селективност и неселективно пропуска methylenblau. Липсата на селективност по отношение на навлизането на багрилото в клетката обхваща дифузно всичките ѝ структури, както елементите на цитоплазмата, така и ядрото, с неговите формирани сегменти, които се багрянт интензивно виолетово- синьо.

Нашата методика за оцветяване на уринен седимент с methylenblau е лесен, достъпен и бърз метод, алтернативен на фазовоконтрастната микроскопия, който надеждно диференцира двата типа левкоцити в уринния седимент при болни с аТИБН. Според нас, тази методика може да бъде ползвана изобщо за доказване виталността на клетки.

4. Заключениено обсъждане

При обобщаването на резултатите от проучването на патофизиологичните аспекти на активния тубуло-интерстициален бактериален нефрит по клинично-лабораторни данни би трябвало да се подчертае, че в основата

на тази идея стоят резултатите и изводите, които следваха от тях, при нашия пилотен проект на реализирания експериментален модел на хематогенен тубуло интерстициален бактериален нефрит (остър хематогенен пиелонефрит) при плъхове.

Тубуло-интерстициалният бактериален нефрит принадлежи към заболяванията на бъбреците, при които се засяга интерстициалната тъкан и тубулите с изменения от възпалително-токсичен характер. Инфекциозните агенти достигат бъбречния паренхим най-често (95-97%) по възходящ път от пикочните пътища и по-рядко (3-5%) – по кръвен (низходящ) път (остър хематогенен пиелонефрит). *E. coli* е най-честият уропатоген, а най-честият причинител на хематогенния пиелонефрит е *St. aureus*.

За реализирането на първата поставена задача - изработване на експериментален модел на активен (остър) хематогенен ТИБН, ние разработихме наша оригинална идея за комбинирано хематогенно инокулиране на нефротропни патогенни бактериални щамове.

Експериментални модели на пиелонефрит могат да се предизвикват чрез инокулиране на бактериите директно в бъбречния паренхим (Yagmurlu A, Boleken ME, Eroty D et al, 2003; Li ML, Liang B et al, 2003; Emamghorashi F et al, 2007 Sadeghi Z, Kajbafzadeh Am, Tajik P et al, 2008) или в пикочния мехур с последваща временна оклузия на уретрата за получаване на уринна задръжка (Görür S, Celik S, Hakverdi S et al, 2008), или в опасната вена след предварително едностранно лигиране на единия уретер с цел уринна задръжка (Kaijser B, Olling S., 1973; Guze LB, Hubert E, Kalmanson GM. Pyelonephritis: VI., 1965).

На базата на литературни данни, сочещи стафилококите като предразполагащ фактор за колипиелонефрит (Breunung M, Breunung MM, Peschel HG., 1971), ние създадохме експериментален модел на хематогенен пиелонефрит без инвазивната процедура – лигиране на уретер. За целта е направено комбинирано хематогенно инокулиране на *E. coli* и *S. aureus* в опасната вена и са проследени клинично-лабораторните показатели: брой левкоцити и С-реактивен протеин (CRP) в кръв, β -2 микроглобулин и активни левкоцити (блестящи клетки) в урина. Бъбречната патология е доказана хистоморфологично.

Третирането на опитните плъхове предизвиква повишаване на нивото на левкоцитите и С-реактивния протеин в кръвта и появата на β -2 микроглобулини и активни левкоцити в урината им.

Повишаването в кръвта на WBC и CRP потвърждава, че животните развиват септично състояние (Povoia P. 2002). Развитието на пиелонефрит се способства от фактори, водещи до задържане и размножаване на ми-

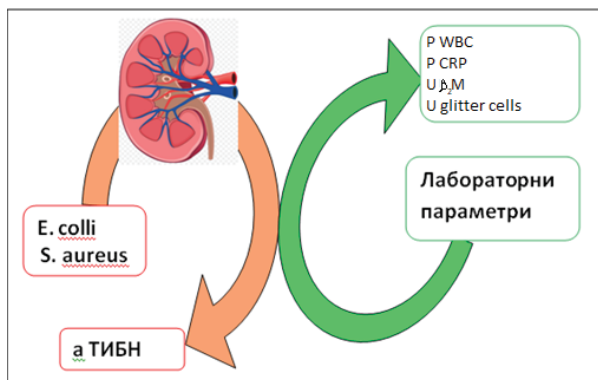
кроби в бъбрека.

При моделите на хематогенен пиелонефрит с *E. coli*, съпроводени от предизвикана чрез лигиране на уретера уринна задръжка (Kaijser B et al., 1973; Guze LB et al., 1965) има асцендентно проникване на бактерии. В този случай бактериите достигат до лумена на тубулите, като се размножават там и проникват през тубулния епител в интерстициума (Tuan H, Hagemann I, Briedigkeit H, et al., 1972).

По-различен е механизмът на развитие на пиелонефрит при комбинираното заразяване с *E. coli* и *St. aureus*. Известно е, че *St. aureus* произвежда коагулаза, която повлиява превръщането на фибриногена във фибрин (Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, et al., 2006) и така се създават благоприятни условия за забавяне на кръвотока в бъбречните вени, като може да се стигне до пълна стаза. Това способства за концентриране на микроби в бъбречните съдове. Изследването на седимент на урина в този етап от развитие на пиелонефрит може да не показва никаква патологична находка или да открива само бактерии. Венозният застой и отокът на паренхимата повишават бъбречното налягане и нарушават тъканната трофика. Това води до снижаване на тъканната съпротива към инфекции и засилване на проникването на микроорганизмите от съдовете в интерстициалната тъкан, където те бързо се размножават. При напредване на процеса на възпаление около огнищата на струпуване на микроби се образува левкоцитен вал. В интерстициалната бъбречна тъкан левкоцитната инфилтрация води до деструкция на бъбречните каналчета в зоната на възпалителния инфилтрат (Sanford JP, Hunter BW, Donaldson P, 1962; Kabore AF, Simard M, Bergeron MG, 1999). В просвета на каналчетата масово проникват сегментоядрени неутрофилни гранулоцити и бактерии, които при тубулната деструкция или чрез нормалния уринопоток попадат в окончателната урина. В този етап на развитие на острия, активен ТИБН има богата находка в седимента, където се установява бактериурия, левкоцитурия и излющени епителни клетки. Откриват се активни левкоцити (блестящи клетки), които поради хипотоничността на урината набъбват и техните цитоплазмени гранули са в постоянно, брауново движение. В резултат на това клетките се виждат като блестящи, особено под фазов контраст. Този тип неутрофили се откриват при инфекции на горните пикочни пътища (ТИБН-пиелонефрит) и при полимикробни инфекции (Hida Y, Yamashita M, Ischikawa M et al., 1996).

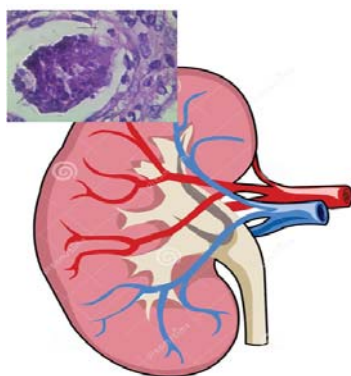
Патологията в проксималните каналчета на бъбрека се обективизира и с повишените нива на β -2 микроглобулин в урината (Fredriksson A., 1975; Schardijn GH, Staius van Eps LW, Pauw W, et al., 1984). β -2 микроглобули-

нът се произвежда непрекъснато от всички ядреносни клетки. Малката молекулна маса (11800 D) му дава възможност свободно да преминава през гломерулната мембрана, но при норма той се реабсорбира 99.9% в проксималните тубули. β -2 микроглобулинурията е един от най-добрите и чувствителни тестове за уточняване на състоянието на проксималните тубули на бъбрека (Фиг. 17.).



Фиг. 17. Експериментален модел на активен ТИБН

Комбинираното хематогенно въвеждане на *St. aureus* и *E. coli* води до развитие на ТИБН при плъхове, който се доказва хистоморфологично (Фиг. 18.) и чрез клинично-лабораторни тестове.



Фиг. 18. Хистоморфологичен ефект при експерименталния модел

Леквоцитурия отсъства в първите дни на острия хематогенен ТИБН. Тя се появява по-късно – след попадането на микроорганизмите в бъбрека при развитието на остри гнойно-възпалителни изменения в паренхима. Откриването на активни левкоцити в уринен седимент доказва наличие на инфекциозно-възпалителен процес в бъбрека. Доказването на морфологични форми на активни левкоцити в седимента на урината (glitter cells), бе реализирано чрез наш цитохимичен метод за визуализирането им. (фиг. 4). Патологията в бъбречните каналчета се обективизира и с повишените нива на β -2 микроглобулин в урината.

Откриването на различни видове протеини в урината служи като индикатор за локализация на бъбречната патология, както и сигнал за увреждането на други органи и системи.

Втората поставена задача включваше апробация (администриране) на нови диагностични критерии за активен ТИБН при прилагане на Европейските насоки за уринен анализ.

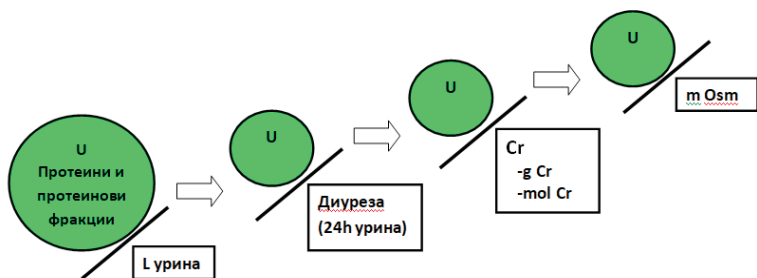
За да се ползваме от точната информация, която можем да получим от тези изследвания е задължително да познаваме правилата за анализ на протеини в урината, начините за представяне на резултатите, както и границите на тези параметри при здрави лица.

За целта направихме апробация на някои уропротеинни маркери при здрави лица, при прилагане на Европейските насоки за уринен анализ при наши условия (Табл. 10,11,12.).

В научната литература въпросът за адаптацията на параметри на протеинурия с клинична значимост стои отдавна (Deville WL et al., 2002; Villafruela JJ et al., 1990). Но за да бъде валидиран в нашата клинична практика, той трябва да бъде добре обоснован (Ninomiya T, Perkovic V et al., 2009; Watanabe Y et al., 2016) .. Определянето на креатинин в урина се използва за оценка на екскреционната скорост на уринни съставки чрез изчисляване на концентрационното им отношение спрямо креатинина (Guder, W et al., 2001; Wan, J. Skoog, S. J., Hulbert, W. C. et al 2012; Wong, I. Y., Shortliffe, L, 2015). За същата цел може да се ползва и mOsm на урина. Така се компенсират вариациите във водната екскреция и протеинурията се обективизира чрез бъбречната филтрация (Cre Vart PScheven L, Lambers et al., 2015; Erman A, Rahamimov R, Mashraki T, et al., 2011; Ima, J., S. Yslam et al., 2007).

Количественото определяне на протеинурията може да се представи чрез различни дименсии: протеин или протеинови фракции, отнесен към литър - L урина, към 24 часова уринна порция, към концентрацията на креатинина в урината, изразена в грам креатинин - g Cr, мол креатинин -

mol Cr, към осмоларитета на урината в mOsm (Kidney Disease, 2013) (Фиг. 19.). Събирането на диуреза крие рискове от неточности в изпълнението си, които могат да бъдат свързани с неточен обем на събираната урина, неправилно съхранение /температура, консервант/ (Abdelmalek JA et al., 2013, Rodrigo E et al., 2003, Vart, P., Scheven, L et al., 2016). Разрушаването на наличните в урината клетки при възпалителен процес, което се получава при престояването ѝ в рамките на 24 часа, може да интерферира върху нивото на протеинурията (Rodrigo E, Pinera C et al., 2003, Witte EC, Lambers Heerspink HJ et al., 2009). Това компроментира дименсията „U протеин /на 24 часа урина“. От друга страна количеството на екскретирувания протеин в различните порции урина търпи физиологични различия, което компроментира дименсията „U протеин/ L урина“. Обвързването на U протеин с величината на бъбречната филтрация представя по най-реален начин количествената характеристика на отделените с урината протеини. Това може да се направи чрез отнасянето на протеина или фракциите му към уринния креатинин - U Cr.



Фиг. 19. Количествено представяне на протеинурия според EG

Ние изследвахме група от 130 здрави лица, при наши регионални условия. Задачата ни бе да представим резултатите за протеинурия в мерни единици, получени от много по-чувствителното отношение на белтък и неговите фракции албумин и β -2 микроглобулин / β -2 M/към креатинин и осмоларитет в урина.

Правилата за определяне на протеини в урината изискват анализ на дадена порция урина с pH между 6-8, изследвана до 1,5 и 2 часа след получаване. Ако не могат да бъдат изпълнени тези условия, то изследваната урина следва да бъде съхранена на 8°C-до 8 часа, на 0°C-до 48 часа или на -20°C-до 2 месеца.

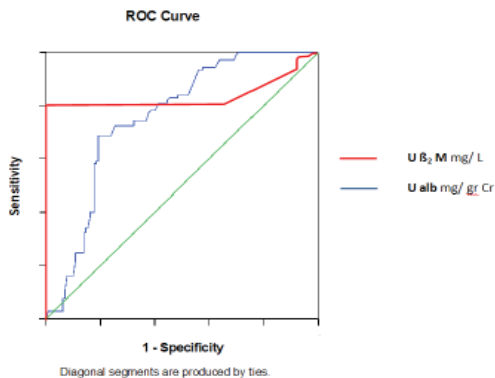
Начините за представяне на резултатите на общите протеини или про-

теиновите фракции в урината, отнесени към креатинина или осмоларитета на тази урина, изразяват по-обективно количественото определяне на уропротеините. Това прави протеинурията по-чувствителен маркер за локализация на бъбречната патология.

В изследването си направихме адаптация на някои уропротеинни маркери при прилагане на Европейските насоки за уринен анализ, като представихме получените от нас резултати на референтна група здрави лица, за количествено определяне в урина на: общ протеин, албумин и β -2 микроглобулин при наши регионални условия, представяйки ги като: уропротеини (общ протеин в урина, представен в дименсии: U protein g/L; U protein g/mol Cr; U protein g/g Cr; U protein g/mOsm, албумин в урина, представен в дименсии: U albumin mg/L; U albumin mg/mol Cr; U albumin mg/g Cr; U albumin mg/mOsm, beta 2 M в урина, представен в дименсии: U β -2 M mg/L; U β -2 M mg/mol Cr; U β -2 M mg/g Cr; U β -2 M mg/mOsm.

Изпълнението на третата поставена задача за прецизиране на алгоритъма на клинично-лабораторни изследвания при активен ТИБН са резултатите от изследване на диагностичната ефективност на уропротеинни маркери: албумин в урина и β -2 M в урина при активен ТИБН с помощта на статистически анализ и интерпретация -ROC анализ на SPSS.

Диагностиката и прогнозирането са важни дейности в клиничната практика. Разликата между диагностика и прогнозиране се състои единствено в реда на събитията: при диагностиката събитието може вече и да е налице в момента, в който се прилага методиката, докато при прогнозирането първо се прилага методиката и по-късно се установява дали патогенетичното събитие е настъпило. За целта ние използвахме възможностите на ROC анализа в SPSS. ROC-кривата (Receiver Operating Characteristic Curve), дава информация за съотношението между сензитивността и специфичността в целия диапазон на възможни аналитични стойности. При построяването на ROC- кривата върху ординатата се нанасят показателите за сензитивност, а по абцисата за специфичност. Мярката представлява площта под ROC-кривата ("Area under the curve" (AUC) или „Площ под кривата" (ППК). Площта под ROC-кривата има смисъл на относителен дял или процент, който бележи различимостта на групите (здрави / болни) (Фиг. 20.).



Фиг. 20. ROC анализ за диагностична значимост(надеждност) на U албумин и U β -2 М при активен ТИБН

Направеният ROC анализ (Табл. 24,26,27., Фиг. 10,11,12.) показват, че използваният тест за U β -2 М има своята диагностична значимост (U β -2 М при а ТИБН - ППК= 0.839 mg/l) при установяване на активност на ТИБН. т.е. тестът U β -2 М mg/l (*при активен*: остър и хронично обострен пиелонефрит - ОПН и ХОПН) има “добра” диагностична надеждност.

Изследването на *U albumin* (mg/g Cr) при активен ТИБН (ОПН и ХОПН - Табл. 19,20,21., Фиг. 8,9.), установява, че ППК = 0.758, т.е. тестът *U albumin* (микроалбумин) (mg/g Cr) при активен ТИБН (ОПН и ХОПН) има “задоволителна” диагностична надеждност.

За реализиране на следващата си задача, ние разработихме и предлагаме бърз и надежден цитохимичен метод за откриване на активни левкоцити (glitter cells) в уринен седимент за диагностика на активен ТИБН.

Нашият метод за визуализиране на левкоцитните популации в урината (Фиг. 13,14,15.) представлява суправитално оцветяване с 1% р-р на metilenblau, при което материал и оцветител се поставят в равни съотношения, размесват се и се оставят във влажна камера за 3 - 5 min, след което една капка се поставя върху предметно стъкло и се притиска с покривно. Гледа се на различни увеличения (препоръчително 10 x 100). При тази методика не е необходимо ползването на фазовоконтрастен микроскоп. Установяват се 2 вида гранулоцитни, сегментоядрени левкоцити – едните са с обичайните размери и форма, слабо различимо ядро и груба зърнистост в протоплазмата. Левкоцитите от втората група е прието да бъдат наричани клетки на Sternheimer-Malbin. Фактът, че при болни с остър ТИБН тези клетки се откриват почти винаги говори, че те биха могли да се

прибавят към лабораторната констелация за диагностициране на активен ТИБН (активен пиелонефрит).

Нашето предложение за алгоритъм за клинично - лабораторни изследвания при активен бактериален тубуло- интерстициален нефрит (активен пиелонефрит) включва:

- изследване на уринен седимент
- изследване на протеинурии

Изследване на уринен седимент:

Етапите на уринния анализ при съмнение за активен ТИБН включват:

1. Тестване на урината за формени елементи с експресни тестове
2. При положителен резултат (включително следи), микроскопско изследване на седимент по ЕГ (или апаратно, при наличие на такава техника).
3. При наличие на левкоцити в урината- оцветяване по предложения от нас цитохимичен метод за доказване на активни левкоцити.

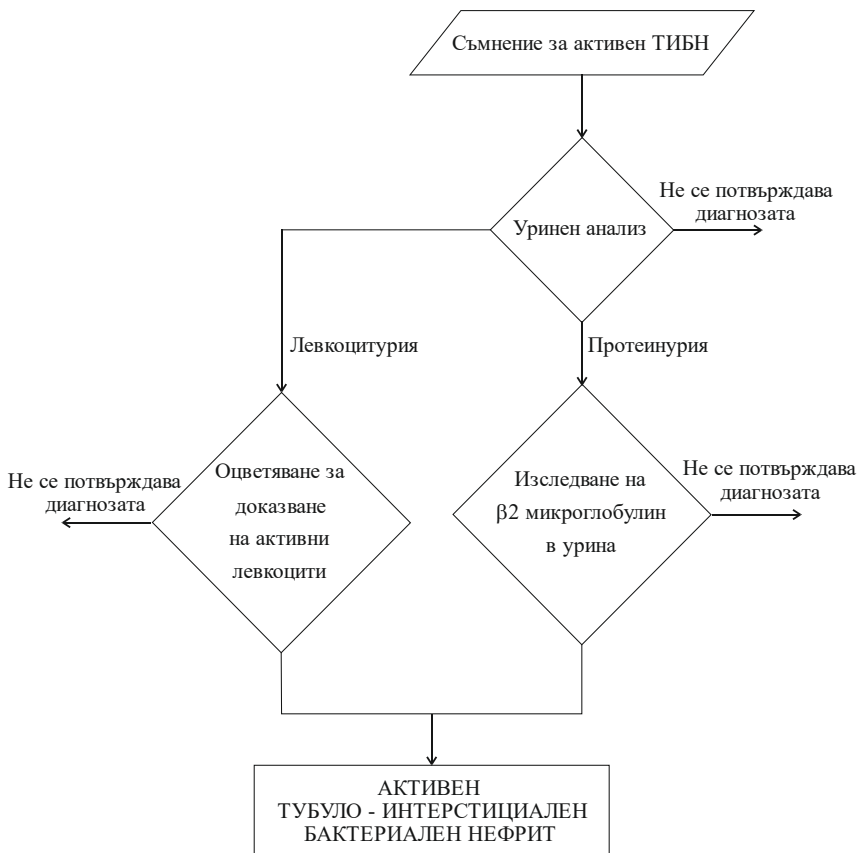
Изследване на протеинурии:

Етапите на белтъчен анализ за диагноза на протеинуриите включват:

1. Тестване на урината за белтък с експресни тестове
 2. При положителен резултат (включително следи), пациентът се изследва още два пъти в продължение на една седмица, за да се отхвърли преходна протеинурия.
 3. Ако два от трите проведени теста са положителни (включително следи) – изследване на урина за определяне на албумин/креатинин - количествен анализ -(минимален панел).
- Ако в две изследвани порции урина се установи албумин / креатининово отношение между 3 и 30 g/mol, без хематурия и без повишение на серумния креатинин, вероятността за самостоятелна бъбречна патология е ниска-добре е пациентът да се консултира с ендокринолог-диабетолог и кардиолог.
 - Ако албумин/креатининовото съотношение е над 30 g/mol, вероятността за първично бъбречно увреждане е висока -добре е пациентът да се консултира с нефролог или уролог. Допълнително се изследват протеин НС, осмоларитет и бета 2 – микроглобулин-отношения (оптимален панел), а при необходимост и достатъчни индикации - имуноглобулин G, λ - и κ -леки вериги, както и макроглобулин (максимален панел).

Изследването на урина е обект на добра перспектива, тъй като получаването на материала е неинвазивно, а резултатите биха могли да се ползват както за поставяне на диагноза, така и за мониторинг на терапия и

прогноза на болестта. Основният проблем при този род анализ си остава нуждата от добра и надеждна стандартизация, която да снижава максимално вероятността от преаналитични грешки.



Фиг. 21. Алгоритъм за клинично - лабораторни изследвания при активен бактериален тубуло- интерстициален нефрит (активен пиелонефрит)

Диференцирането на протеинуриите с помощта на маркерни индивидуални белтъци и белтъчни отношения и изследването на формени елементи е неразделна част на патологичната уринна находка и винаги следва да се включва в комплексния клинично-лабораторен анализ и оценка на данни, които се интерпретират заедно с общите лабораторни и инструментални изследвания и в конкретния клиничен контекст.

ИЗВОДИ

1. Комбинираното хематогенно въвеждане на *St. aureus* и *E. coli* при интактни мъжки плъхове порода Wistar води до развитие на активен тубуло интерстициален бактериален нефрит (аТИБН), който се доказва хистопатологично и чрез клинично-лабораторни показатели:
 - Изследването на седимент на урина в началния етап от развитие на активния тубуло-интерстициален бактериален нефрит може да не показва никаква патологична находка или да открива само бактерии.
 - Леквоцитурия отсъства в първите дни на аТИБН. Тя се появява по-късно – след попадането на микроорганизмите в бъбрека при развитието на остри гнойно-възпалителни изменения в паренхима.
 - Откриването на активни левкоцити (glitter crlls), в уринен седимент доказва наличие на инфекциозно-възпалителен процес в бъбрека.
 - Патологията в бъбречните каналчета се обективизира и с повишените нива на β -2 микроглобулин в урината.
2. Правилата за анализ на протеини в урината изискват изследване на дадена порция урина с рН между 6-8, до 1, 1,5 часа след получаването ѝ. Въвеждането на EG за анализ на уропротеини стандартизира условията и води до увеличаване на надеждността на получените лабораторни резултати:
 - За да се ползваме от точната информация, която можем да получим от тези изследвания е задължително да познаваме правилата за анализ на протеини в урината, начините за представяне на резултатите, както и границите на тези параметри при здрави лица.
 - Начините за представяне на резултатите на общите протеини или протеиновите фракции в урината, отнесени към креатинина или осмоляритета на тази уринна порция, изразяват по-обективно количественото определяне на уропротеините.
 - Този начин на представяне, прави протеинурията по-чувствителен маркер за локализация на бъбречната патология.
 - Апробирането на получените от нас резултати на референтна група лица за количествено определяне в урина на: *общ протеин*, албумин и β -2 микроглобулин при наши регионални условия е един опит да бъдат адаптирани техните референции локално, за по-голяма обективност.

3. Нашето предложение за алгоритъм на клинично - лабораторни изследвания при активен бактериален тубуло- интерстициален нефрит (активен пиелонефрит) включва:
 - Изследване на уринен седимент -цитоморфология на левкоцитни субпопулации
 - Изследване на протеинурии, представени според EG
4. Предложената от нас методика за оцветяване на уринен седимент с methylenblau е лесен, достъпен и бърз метод, алтернативен на фазовоконтрастната микроскопия, който надеждно диференцира активните гранулоцитни левкоцити (glitter crlls) в уринния седимент при болни с акивен ТИБН.
 - При болни с диагностициран аТИБН тези клетки се откриват почти винаги.
 - От това може да се направи извода, че те биха могли да се прибавят към лабораторната констелация за диагностициране на активен тубуло-интерстициален бактериален нефрит.
 - Може да приемем, че ползата от клетките на Sterncheimer-Malbin за диагнозата на аТИБН е в бързата ориентация при огледа на седимента. Чрез тях могат да бъдат морфологично определени активните гранулоцити в урината.
 - Чрез предлагания от нас лесен, удобен, бърз и достъпен метод за определяне на „glitter cells” може да бъде улеснена и ускорена диагностиката на активните възпалителни процеси на отделителната система.
 - Предложеният от нас метод за морфологично диференциране на левкоцитите в уринния седимент с methylenblau, който ние сравнихме с утвърдения от СЗО метод за доказване на витални сперматозоиди с Eosin Yellow, но използван от нас за левкоцити в уринен седимент, показва много добри резултати, което ни навежда на мисълта, че нашият метод би могъл да се ползва за представяне изобщо на виталитет на клетки/култури /.

Изследването на урина е много перспективен анализ, тъй като получаването на анализирания материал е неинвазивно, а при добри познания от страна на лекаря, много често резултатите директно поставят диагнозата, мониторират терапията и интерпретират рисковете от усложнения.

НАУЧНИ ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. Представен е експериментален модел на активен апостематозен ТИБН, реализиран чрез комбинация от нефротропни патогенни бактерии.
2. Администрирани са протеинни маркери: U protein; U albumin; U β -2 M, представени според Европейските изисквания при референтна група здрави лица при наши локални условия.
3. Намерени са гранични стойности на U albumin mg/g Cr и U β -2 M mg/L при активен ТИБН (аТИБН), като е определена диагностичната им надеждност.
4. Представен е наш метод за откриване и доказване на активни левкоцити (glitter cells) в уринен седимент при активен ТИБН, който може да бъде ползван изобщо за доказване виталност на клетки.

Приноси с потвърдителен характер

1. Доказана е ползата и надеждността от изследване на уропротеини, като маркери за локализация на процеса при UTIs.
2. Определянето на диагностичната надеждност на U β -2 M потвърждава патогенезата на аТИБН.
3. Наличието на glitter cells доказва възпалителния характер на процеса.
4. Разработена е методика, допълваща алгоритъма за поведение при диагностика и терапевтичен мониторинг на пациенти с аТИБН.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в научни списания

Танчева Стоянка, Към диагностиката на тубуло - инстерциалния бактериален нефрит. Нефрология, диализа и трансплантация, год. 16, 2, **2010**, 9 - 17.

Tancheva Stoyanka, Stefka V. Valcheva - Kuzmanova, Radko Zl. Radev, Miroslav D. Marinov, Borislav Boychev, Temenuga Stoeva, Svetlozara K. Boyadjieva, Kiril Sv. Nenov. A model of experimental acute hematogenous pyelonephritis in the rat. Folia Medica, 53(2), **2011**, 63- 68.

Танчева Стоянка, Теофан Базан, Андрей Забунов, Кристиан Йеремиев, Светла Стайкова, Кирил Ненов, Даниела Малчева. Адаптация на параметри на протеинурия с клинична значимост, MD, бр2(98), Год. XIV, април **2017**, 71 -76.

Публикувани резюмета на научни съобщения и доклади

Танчева С., Хр. Сапунджиев: Европейски стандарти за изследване на белтък в урината, // Научна конференция с международно участие – Стара Загора **2004**, т. IV, ч.2 Диагностика, терапия и хирургия. Социална медицина и психология, с. 61-66- доклад.

Танчева С., Хр. Сапунджиев: Адаптиране към Европейските стандарти за протеинурия, // IV Национален конгрес по нефрология \ XVII Дунавски симпозиум по нефрология, София, 07-10, окт. **2004**- доклад.

Танчева С., Хр. Сапунджиев: Случай на тежко протекла нефропатия на бременността при хроничен пиелонефрит, проследена чрез протеинурията, Съюз на учените Варна, 18 окт. **2004**- доклад.

Танчева С., Хр. Сапунджиев: Отклонения в липидния профил при болни с хроничен пиелонефрит и хронична бъбречна недостатъчност, // V Национална конференция с международно участие „Диализата в XXI век“, 13-14 юни **2005**- доклад.

Танчева С., Хр.Сапунджиев: Клинично значение на С-реактивен протеин (СРР) при възпалителни заболявания на горните и долни пикочни пътища, Научна конференция с международно участие, Съюз на учените Ст. Загора, 02-03 юни **2005**- доклад.

Танчева С., Хр.Сапунджиев: Клинико-лабораторна интерпретация на остри и изострени пиелонефрити, Трета Национална конференция по Клинична лаборатория с международно участие, 27-28 септ. **2005**- доклад.

Танчева С.: Цитохимична диагноза на хроничен латентен пиелонефрит, Първи Национален конгрес по обща медицина с международно участие, 03-06 ноември **2005**, 43- доклад.

Танчева С., Хр.Сапунджиев: Клинико-лабораторни и ехографски промени при диагнозата на активен пиелонефрит, Първи Национален конгрес по обща медицина с международно участие, 03-06 ноември **2005**, 44- доклад.

Танчева С., Р. Радев, М. Маринов: Модел на остър експериментален хематогенен пиелонефрит, Научна сесия МУ-Варна, 27-29 септ. **2006**- доклад.

Tancheva S.: Laboratory indexis proving active pyelonephritis, 14 Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, Sofia, 27-30 sept. **2006**, pp. 135-136- доклад.

Танчева С., К. Ненов: Изследване на химичния съства на бъбречните конкременти при болни с хроничен калкулозен пиелонферит във Варненска област, Танчева С., К. Ненов, Научен симпозиум „Диализата в XXI век“, 11-12 май **2007**, Актуална нефрология, 7, 14-15- доклад.

Танчева С., Д. Близнакова, Ал. Стоянов: С-реактивният протеин като начин за проследяване на лечението при интерстициален бактериален нефрит, Научен симпозиум „Диализата в XXI век“, 11-12 май, **2007**, Актуална нефрология, 7, 15-16- доклад.

Танчева Ст., Т.Райнова, Е Ахмед, М Аврамова, Йо Йонков, Уринен седимент при активен пиелонефрит. ВМФ, том3,(4), прилож.2, **2014** - доклад

Танчева Ст., Т.Базан,К.Йеремиев, А. Забунов, Йо Йонков, Бета две микроглобулин и албумин в урина при пациенти с тубуло-интерстициален бактериален нефрит- диагностична ефективност, ВМФ, том 4, прил.3, **2015**, 528-536 - доклад