

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

Факултет Здравни грижи

Катедра „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология“

Д-р Ирена Иванова Генчева – Ангелова

ХОМОЦИСТЕИН И ДРУГИ БИОМАРКЕРИ СВЪРЗАНИ С РАЗВИТИЕТО НА СЪДОВИ ИНЦИДЕНТИ ПРИ ПАЦИЕНТИ НА ХРОНИОДИАЛИЗА

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“ по научната специалност „Клинична лаборатория“

Научен ръководител:

Доц. д-р Аделаида Русева, дм.

Рецензенти:

Проф. д-р Красимира Икономова, дм

Доц. д-р Лиляна Ламбрева, дм

Плевен

2016г.

Дисертационният труд съдържа 170 страници и е структуриран в следните раздели: Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати, Обсъждане, Изводи, Приноси, Приложения и Библиография. Илюстриран е с 22 таблици и 23 фигури. Библиографската справка включва 187 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от катедра „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология“, МУ – Плевен.

Проучването включва 120 лица на диализно лечение и 20 клинично здрави лица.

Включените в дисертационният труд изследвания са извършени в МДКЛ на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 12.09.2016г. от 12:30 ч. в зала „Гален“ на МУ – Плевен.

Материалите по защитата на дисертационния труд са публикувани на страницата на Медицински университет – Плевен (<http://www.mu-pleven.bg>)

СЪДЪРЖАНИЕ:

I.Въведение.....	5
II.Цел и задачи.....	7
III. Материал и методи.....	9
IV.Резултати.....	21
V. Изводи.....	61
VI. Приноси.....	63
VII. Списък на научните трудове, свързани с дисертационния труд.....	65

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АХ	Артериална хипертония
ГФ	Гломерулната филтрация
ЗД	Захарен диабет
МСБ	Мозъчно – съдова болест
ОБУ	Остра бъбречна увреда
СЗО	Световната Здравна Организация
СН	Сърдечна недостатъчност
ССЗ	Сърдечно- съдови заболявания
ХБЗ	Хронично бъбречно заболяване
ХБН	Хронична бъбречна недостатъчност
ХБУ	Хронична бъбречна увреда
ADO	Adenosine
AKI	Acute kidney injury
Alb	Albumin
ATP	Adenosine triphosphate
Chol	Cholesterol
CKD	Cronic kidney disease
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CrCl	Creatintne clearance
Crea	Creatinine
CRP	C-reactive protein
CVD	Chronic vascular disease
EIA	Enzyme immunoassay

ESRD	End-stage renal disease
FRISC	Fragmin during instability in coronary artery disease
GFR	Glomerular filtration rate
GLDH	Glutamate dehydrogenase
Hcy	Homocysteine
HDL	High- density lipoprotein
HHCY	Hyperhomocysteinemia
HPLC	High-performance liquid chromatography
hs-CRP	High-sensitivity C-reactive protein
IdMS	Isotope Dilution Mass Spectrometry
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
LDL	Low-density lipoprotein
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease Study Group
P	Phosphorus
SAH	S-Adenosyl-L-homocysteine
SAM	S-аденозил метионин
sdLDL	Small dense low-density lipoprotein
SNKFKDOQI	National Kidney Foundation Kidney Disease OutcomesQuality Initiative
tHcy	Total homocysteine
THF	Tetrahydrofolate
Tg	Triglyceride

I Въведение

Хроничната бъбречна увреда като една от основните причини за нарастващата честота на бъбречните заболявания, през последното десетилетие стана предмет на дългогодишни проспективни проучвания, на които дължим съвременните представи за патогенезата на това заболяване и неговата профилактика. Редица проучвания показват, че дори и в ранните стадии на хронично бъбречно заболяване (ХБЗ), при които напълно отсъстват каквито и да било оплаквания от страна на пациента, смъртността от остри сърдечно - съдови заболявания е с над 50% по-висока, в сравнение със смъртността при хората със здрави бъбреци. С напредване на бъбречното заболяване и с развитието на бъбречната недостатъчност, особено при пациентите с терминален стадий на хронична бъбречна недостатъчност, смъртността от остри сърдечни и мозъчни съдови инциденти (сърдечни инфаркти и мозъчни инсулти) нараства многократно в сравнение със смъртността сред здравите индивиди.

Две трети от причините водещи до ХБЗ се дължат само на диабет и хипертония. Сред пациентите, които започват хемодиализно лечение, най-много са тези със захарен диабет и в частност с диабетна нефропатия. Артериалната хипертония е вторият важен фактор за хроничното бъбречно заболяване. Тя води до развитие на хипертонична нефроангиосклероза. Това състояние прогресира обикновено по-бавно, но високата му честота го прави сериозен рисков фактор за възникване на ХБЗ.

Поради всички тези факти и с цел намаляване риска от смърт поради съдови инциденти в световен мащаб се разработват програми за ранно откриване и лечение на началните стадии на ХБЗ, тъй като е напълно

възможно забавянето и дори спирането на развитието на ХБЗ, когато то е диагностицирано в ранен стадий.

Освен общоизвестните рискови фактори (пол, възраст, тютюнопушене, високо кръвно налягане, стрес, повишени серумни нива на холестерол, триглицериди и пр.) за развитието на съдово заболяване при пациентите с ХБЗ и последващ фатален инцидент, през последните години като независим рисков фактор се сочи повишеното ниво на аминокиселината хомоцистеин. През последните години все повече колективи включват хомоцистеина в изследователски програми за профилактика на сърдечно –съдовия риск сред големи групи от населението. У нас, за съжаление, изследването на хомоцистеин все още не е получило достатъчно широко приложение, въпреки доказващата се ефективност на този показател. Необходимо е използването на надежден метод, който да е бърз и достъпен за широката практика.

Получените данни за ролята на хомоцистеина като рисков фактор за развитието на съдови заболявания са все още непълни, а в отделни случаи - и противоречиви. Използването на хомоцистеина самостоятелно, като независим рисков фактор или в комбинация с други лабораторни биомаркери, е все още недобре проучено. У нас изследването на хомоцистеин при пациенти с хронична бъбречна увреда (ХБУ) и ролята му в диагностиката на риска от съдов инцидент при тези пациентие все още недобре изяснена.

II Цел и задачи

Цел

Целта на настоящата работа е да се въведе и верифицира високоспецифичен метод за определяне на серумен хомоцистеин, да се оцени прогностичната му стойност като независим рисков фактор самостоятелно и/или в комбинация с други лабораторни биомаркери по отношение на развитие на съдов инцидент (инфаркт или инсулт), и смърт вследствие на такъв при пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадий V, на хемодиализа.

Задачи

1. Въвеждане и верифициране на метод за определяне на тотален хомоцистеин, базиран на нов принцип на тестване с ензимна цикличност, който оценява продукта от превръщането на ко субстрат, вместо да оценява ко субстрата или продуктите от превръщането на Нсу.
2. Сравнение на ензимния метод за определяне на креатинин с кинетичния метод на Яфе.
3. Определяне на диагностичната специфичност и чувствителност на тоталния хомоцистеин.
4. Определяне на предиктивната стойност - положителна и отрицателна предсказваща стойност

5. Оценка на прогностичната стойност на тоталния хомоцистеин като независим рисков фактор за възникване на съдов инцидент при пациенти на хемодиализа.
 - а/ Прогностична стойност на тоталния хомоцистеин в областта под 50 $\mu\text{mol/L}$
 - б/ Прогностична стойност на тоталния хомоцистеин в областта над 50 $\mu\text{mol/L}$
6. Оценка на прогностичната стойност на тоталния хомоцистеин в комбинация с други лабораторни биомаркери като рискови фактори за възникване на съдов инцидент при пациенти на хемодиализа:
 - а/ Хомоцистеин и показатели на липидната обмяна: холестерол, триглицериди, HDL и LDL;
 - б/ Хомоцистеин и hsCRP;
 - в/ Хомоцистеин и креатинин;
 - г/ Хомоцистеин и серумен албумин.

III Материал и методи

При събиране на научната информация са използвани:

1. Анкетен метод

За подбор на изследваните лица е използван анкетният метод, което е отразено в картите за прием на пациенти. Данните са попълнени от лекуващите лекари.

2. Клиничен метод

При всички включени в проучването лица е проведен клиничен преглед преди извършените лабораторни изследвания. Проучването включва 120 пациенти в V стадий на хронична бъбречна недостатъчност на хемодиализа. Проследявани са за период от 1 година (06.2014 – 06.2015г.). От тях 29 пациента са със диабет, а 33 са с артериална хипертония. За периода на проучването са починали 16 пациента: 11 от инфаркт на миокарда и 5 от мозъчно-съдова болест.

3. Лабораторни изследвания

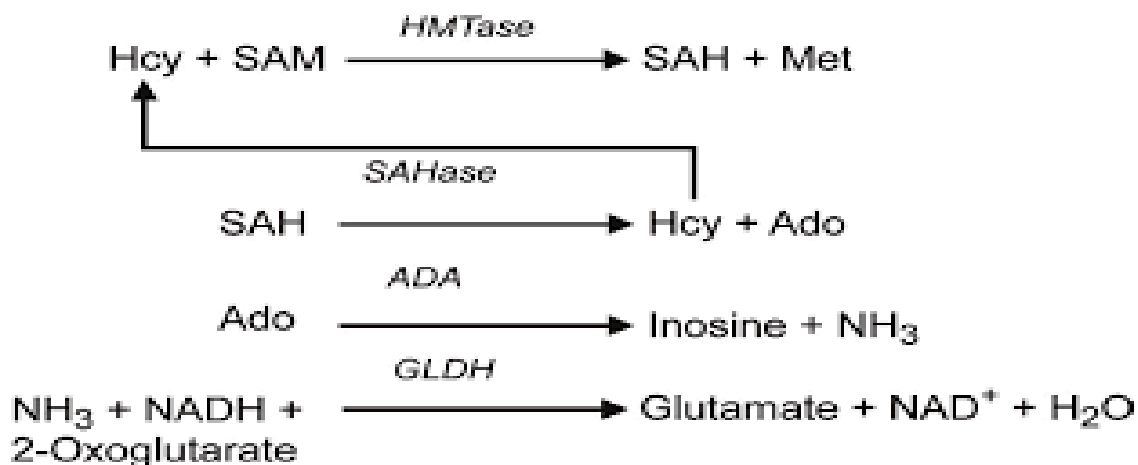
При провеждане на всички лабораторни изследвания са спазени изискванията на Медицинския стандарт по Клинична лаборатория и Международния стандарт за качество и компетентност на медицинските лаборатории ISO15189.

3.1 Определяне на хомоцистеин

За определяне на концентрацията на хомоцистеин е използван ин витро тест за количествено определяне на тотален L – хомоцистеин в човешки серум със система на Roche – Cobas Integra 400.

а/ Принцип на метода

Homocysteine Enzymatic Assay се основава на нов принцип на тестване с ензимна цикличност, който оценява продукта от превръщането на ко-субстрат, вместо да оценява ко-субстрата или продуктите от превръщането на Hcy. В този тест оксидираният Hcy първо се редуцира до свободен Hcy, който след това реагира с ко-субстрат, S-аденозилметионин (SAM) до образуването на метионин (Met) и S-аденозилхомоцистеин (SAH), катализиран от HcyS-метилтрансфераза. SAH се оценява чрез свързани ензимни реакции, където SAH се хидролизира в аденозин (Ado) и Hcy от SAH хидролаза, а Hcy се циклира в реакция на превръщане на Hcy до образуването на реакционен цикъл, който усилва сигнала на откриване. Образуваният аденозин се хидролизира незабавно в инозин и амоняк. В последната стъпка ензимът глутаматдехидрогеназа (GLDH) катализира реакцията на амоняк с 2-оксоглутарат и NADH до образуването на NAD⁺. Концентрацията на Hcy в пробата е правопрпорционална на количеството на NADH, превърнатата в NAD⁺(ΔA340 nm).



б/ Реактиви – реактив на Roche, разработен за системите на Roche

Реактив 1 - NADHS-аденозилметионин 0.1 mmol/L, TCEP* > 0.5 mmol/L (*Трис(2 карбоксиетил)фосфин), - оксоглутарат < 5.0 mmol/L, NADH > 0.2 mmol/L, буфер, рН 9.1(25 °С), консервант, стабилизатор

Реактив 2 - Ензимен реактив

ХомоцистеинS-метилтрансфераза (HMTase) 5.0 kU/L, глутамат-деhydroгеназа (GLDH)10 kU/L, казеин (говежди) ≤ 0.2 % , буфер, рН 7.2 (25 °С), консервант, детергент.

Реактив 3 - Стартов реактив

Аденозиндеаминаза (говежди)5.0 kU/L, S-аденозил-хомоцистеин –хидролаза (SAHase)3.0 kU/L, казеин(говежди) ≤ 0.2 % , буфер рН 7.2(25 °С), консервант, стабилизатор.

в/ биологичен материал - Серум

Кръвните проби са центрофугирани веднага след събиране, за да се отдели серума от кръвните клетки. Хемолизирани или мътни проби, както и силно липемични проби, не са използвани за анализа на хомоцистеин, според препоръките на производителя на теста.

Стабилност на пробите: 4 дни при 15-25 °С, 4 седмици при 2-8 °С, 10 месеца при -20 °С.

г) Калибрация – извършва се с калибратор на производителя, HCYS Calibrator kit S 1-5 (lot № 600 424- 01). Прицелната стойност на калибратора е проследима до стандартизиран референтен материал SRM 1955 на NIST(CLSI) – Института за клинични и лабораторни стандарти на САЩ. Режим на калибрация RCM.

д) Качествен контрол - Използваните контроли са HCY Control Kit (Lot№ 600 425- 01): Control 1 със стойности от 10.3 µmol/L до 14.5 µmol/L, средно 12.4 µmol/L , и Control 2 - от 31.1 µmol/L до 41.9 µmol/L , средно 36.5 µmol/L ;

е) Техника – процедурата с Cobas Integra 400 е напълно автоматизирана.

3.2 Определяне на креатинин

За сравнението на двата метода за определяне на креатинин – метода на Jaffe и ензимния метод, изследвахме 104 проби.

3.2.1 Определяне на креатинин по метода на Jaffe

Ин витро тест за количествено определяне на креатинин посредством системите Cobas Integra 400.

а/ Принцип на метода

Кинетичен колориметричен тест, базиращ се на метода на Jaffé. В алкален разтвор креатининът образува жълто-червен комплекс с пикрат. Скоростта на образуване на багрилото е пропорционална на концентрацията на креатинин в пробата. За да се коригира неспецифичната реакция,

причинена от псевдо – креатинин хромогените в серум, включително протеини и кетони, резултатите за серум се коригират с $-18 \mu\text{mol/L}$.

б/ Реактиви

Реактив 1 – Калиев хидроксид: 900 mmol/L ; фосфат: 135 mmol/L ; $\text{pH} \geq 13.5$

Реактив 2 – Пикринова киселина: 38 mmol/L ; $\text{pH} 6.5$; нереактивен буфер

в/ Биологичен материал - Серум без липемия

г/ За стандартизация се използва Calibrator c.f.a.s.(lot № 179 974-01)

Като нулева точка се използва дейонизирана вода. Методът на калибрация е линейна регресия. Методът е стандартизиран спрямо ID/MS.

д/ Контроли – Използвани са контролни материали в референтен и патологичен обхват – Precicontrol ClinChem Multi 1(lot № 174 787-04) и Precicontrol ClinChem Multi 2(lot № 174 801-02)

е/Техника – процедурата с Cobas Integra 400 е напълно автоматизирана.

3.2.2 Определяне на креатинин с ензимен метод

Инвитро тест за количественото определяне на концентрацията на креатинин в човешки серум и плазма в системите Cobas Integra 400.

а/ Принцип на метода

Ензимен кинетичен колориметричен метод. Основава се на метода на превръщането на креатинин, с помощта на креатининаза, креатиназа и саркозин оксидаза, в глицин, формалдехид и водороден пероксид. Катализиран от пероксидазата, освободеният водороден прекис реагира с 4-аминофеназон и НТІВ (2,4,6-трийодо-3-хидроксибензоена киселина) за образуване на хиноновимин хромоген. Интензивността на цвета на образувания хинонов имин хромоген е право пропорционална на концентрацията на креатинин в реакционната смес.

б/ Реактиви

Реактив 1 – TAPS(N-Трис(хидроксиметил)метил-3-аминопропансулфонова киселина) буфер: 30 mmol/L, рН 8.1; креатиназа (микроорганизми): ≥ 332 $\mu\text{kat/L}$; саркозин оксидаза (микроорганизми): ≥ 132 $\mu\text{kat/L}$; аскорбат оксидаза (микроорганизми): ≥ 33 $\mu\text{kat/L}$; Каталаза (микроорганизми): ≥ 1.67 $\mu\text{kat/L}$; НТІВ: 1.2 g/L; детергенти; консервант SR

Реактив 2 - TAPS (N-Трис(хидроксиметил)метил-3-аминопропансулфонова киселина) буфер: 50 mmol/L, рН 8.0; креатининаза (микроорганизми): ≥ 498 $\mu\text{kat/L}$; пероксидаза (хрян): ≥ 16.6 $\mu\text{kat/L}$; 4-аминофеназон: 0.5 g/L; калиев хексацианоферат (II): 60 mg/L; детергент; консервант

в/ Биологичен материал - Серум

г/ За стандартизация се използва Calibrator c.f.a.s.(lot № 179 974-01)

Като нулева точка се използва дейонизирана вода. Методът на калибрация е линейна регресия. Методът е стандартизиран спрямо ID/MS.

д/ Контроли – Използвани са контролни материали в референтен и патологичен обхват – Precicontrol ClinChem Multi 1 (lot № 174 787-04) и Precicontrol ClinChem Multi 2 (lot № 174 801-02)

е/ Техника – процедурата с Cobas Integra 400 е напълно автоматизирана.

3.3 Определяне на останалите лабораторни показатели

3.3.1 Определяне на hsCRP

Имунотурбидиметричен анализ с частици. Човешкият С-реактивен протеин аглутинира с частици латекс, покрити с моноклонални анти - CRP антитела. Преципитатът се определя турбидиметрично.

3.3.2 Определяне на показателите на липидната обмяна

а/ Холестерол - Ензимен, колориметричен метод. Холестероловите естери се разграждат от действието на холестерол естераза до получаването на холестерол и мастни киселини. Тогава холестерол оксидаза катализира оксидирането на холестерола. В присъствието на пероксидаза, образуваният водороден прекис влияе на окислителното свързване на фенол и 4 - аминокантипирин до образуването на червено хинон – имин багрило. Интензитетът на цвета на образуваното багрило е право пропорционален на концентрацията на холестерола. Тя се определя чрез измерване на увеличението в абсорбцията при 512 nm.

б/ Триглицериди - Ензимен, колориметричен метод. Този метод се базира на труда на Wahlefeld, използвайки липопротеинлипаза от микроорганизми, за бързата и пълна хидролиза на триглицериди до глицерол, следвана от оксидиране до дихидроксиацетонфосфат и водороден прекис. След това полученият водороден прекис реагира с 4-аминофеназони 4-хлорофенол под каталитичното действие на пероксидаза, до образуването на червено багрилно вещество (крайно точкова реакция на Trinder). Интензивността на цвета на образуваното червено багрило е право пропорционална на концентрацията на триглицериди и може да се измери фотометрично.

в/ HDLхолестерол - Хомогенен ензимен колориметричен тест. В присъствието на магнезиеви йони, декстран сулфата избирателно образува разтворими във вода комплекси с LDL, VLDL и хиломикрони, които са резистентни към PEG - модифицирани ензими. Холестеролната концентрация на HDL - холестерол е определена ензимно чрез холестеролестераза и холестеролоксидаза, свързани с PEG към аминок групите (прибл.40%).

г/ **LDL**холестерол - Хомогенен ензимен колориметричен тест. В присъствието на пероксидаза генерираният водороден прекис реагира с 4-аминоантипирин и HSDA до образуването на пурпурно-синьо багрило. Интензивността на цвета на това багрило е право пропорционална на концентрацията на холестерол и се измерва фотометрично.

3.3.3 Определяне на албумин

Колориметричен тест. При рН стойност от 4.1, албуминът показва достатъчно катионен заряд, за да може да се свърже с бромкрезол зелено (BCG), анионно багрило, до образуването на синьо-зелен комплекс. Интензивността на синьо-зеления цвят е право пропорционална на концентрацията на албумин в пробата и се измерва фотометрично.

3.3.4 Определяне на урея

Кинетичен тест с уреаза и глутамат дехидрогеназа. Уреята се хидролизира от уреаза, до образуването на амониев радикал и карбонат. Във втората реакция 2 - оксоглутарат реагира с амониевия радикал в присъствието на глутамат дехидрогеназа (GLDH) и коензима NADH, до образуването на L - глутамат. В тази реакция два мола NADH се оксидират до NAD^+ за всеки мол хидролизирана урея. Скоростта на намаляване на концентрацията на NADH е право пропорционална на концентрацията на урея в пробата. Тя се определя чрез измерване на абсорбцията при 340 nm.

3.3.5 Определяне на пикочна киселина

Ензимен колориметричен тест. Уриказата разгражда пикочната киселина до образуването на алантоин и водороден прекис. Интензивността на цвета на образувания хинон - диимин е право пропорционална на

концентрацията на пикочна киселина и се определя чрез измерване нарастването в абсорбцията при 552 nm.

3.3.6 Определяне на желязо

Колориметричен тест. При киселинни условия желязото се освобождава от трансферин. Липемичните проби се пречистват с детергент. Аскорбат редуцира освободените Fe 3+ йони до Fe 2+ йони, които след това реагират с FerroZine, при което се образува оцветен комплекс. Интензитетът на цвета на това багрило е право пропорционален на концентрацията на желязо и може да се измери фотометрично.

3.3.7 Определяне на електролити.

Калций - Калциевите йони реагират с 5-нитро-5'-метил-ВАРТА (NM-ВАРТА) в алкални условия до образуването на комплекс. Този комплекс реагира във втората стъпка с EDTA. Промяната в абсорбцията е право пропорционална на концентрацията на калций и се измерва фотометрично.

Фосфор - Методът се основава на реакцията на фосфат с амониев молибдат, до образуването на амониев фосфомолибдат без редуциране. Неорганичният фосфат образува амониев фосфомолибдат комплекс с формулата $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_2]$ с амониев молибдат в присъствието на сярна киселина. Концентрацията на образувания фосфомолибдат е право пропорционална на концентрацията на неорганичен фосфат и се измерва фотометрично.

Натрий - Определяне с директна потенциометрия.

Калий - Определяне с директна потенциометрия.

4 Статистически методи

Статистическите изследвания са извършени с адекватни методи, съобразени с характера на разглежданите явления и естеството на данните за тях. Използваната методология включва:

1. Критерии за валидизация

Оценяване на специфичност и чувствителност на диагностични тестове чрез ROC криви. За оценяване на валидността на скриниращия тест се използват следните критерии:

- Чувствителност
- Специфичност
- Положително предсказваща стойност
- Отрицателна предсказваща стойност
- Точност (% на верните отговори)

Табл 1. Оценяване на диагностични тестове

Диагноза	Резултати от теста		Всичко
	Положителни	Отрицателни	
Болни	a	b	a+b
Здрави	c	d	c+d
Всичко	a+c	b+d	N

Диагностичните качества на биохимични показатели оценяваме чрез ROC криви, базирани върху чувствителността и специфичността на тестовете. По смисъла на табл.2 чувствителността се дефинира с дяла на положителните случаи от теста (a) в групата на действително болните (a+b) към самата група, т.е. с отношението $a/(a+b)$, а специфичността – с

отношението на отрицателните случаи според теста (d) сред групата на здравите (c+d), т.е. с релацията $d/(c+d)$.

2. Анализ на честотни разпределения:

2.1. Графично представяне

Данните за честотните разпределения по отношение на изследвания показател са отразени в графична форма, съчетано с някои по-обща статистически величини, произтичащи от групировката на стойностите му.

2.2. Описание на формата

За установяване на формата на честотните разпределения (дали емпиричните разпределения наподобяват нормална, симетрична крива или са далеч от нея) е използван критерия на Колмогоров – Смирнов (Z).

2.3. Определяне на основни мерки на централната тенденция и статистическото разсейване.

Централната тенденция е описана чрез средната аритметична стойност (X_{cp}), когато формата на емпиричното разпределение наподобява нормална крива или чрез медианата (Me), когато разпределението не е нормално.

3. Сравняване на извадки. Оценяване на разлики

Използва се за оценяване на различията между групи от пациенти по отношение на даден показател .

4. Анализ на статистически връзки

Необходимо е да се установи дали между определени показатели съществува или несъществува статистически валидна връзка; да се оцени нейната сила, когато вида и обема на данните го позволяват.

4.1. Хи квадрат метод и точен критерий на Фишер.

Хи квадрат методът и точният критерий на Фишер се прилагат (съчетано с крос-таблицы) за установяване на статистическа валидност на връзки между естествени или изкуствено създадени за целите на анализа категорийни показатели.

4.2. Корелационен и регресионен анализ

Чрез него са установени и оценени единични корелации с различни количествени променливи в рамките на дадена група и на части от нея.

Възможните значения на коефициента на корелация (r) са в границите от 0 до ± 1 . Ако $r = 0$, връзка липсва. Коефициентът се проверява за статистическа значимост. От значение са връзки с $r > 0,4 - 0,5$.

4.3. Логистична регресия – Използва се за моделиране на връзки

5. Динамичен статистически анализ:

5.1. Формиране на временни редове

5.2. Моделиране на тенденции в динамиката на клинично–лабораторните показатели

IV Резултати

Проучването е планирано с оглед проучване на възможностите за разширение на използваните у нас лабораторни маркери за предсказване на риска от развитие на съдов инцидент сред пациентите на хемодиализа. Най-честата причина за смърт при тези пациенти е развитие на съдово заболяване (инфаркт или инсулт). Рискът значително се увеличава при пациентите, които имат и съпътстващо друго заболяване – захарен диабет или артериална хипертония.

За да изпълним поставените си цел и задачи, да изследваме и докажем влиянието на много фактори върху смъртността от сърдечно –съдови и мозъчно – съдови инциденти при пациентите на диализа ни бе необходим силен статистически пакет от програми, които да ни помогнат в обработката на данните от проучването. С помощта на използваните статистически програми (SPSS), ние успяхме да анализираме предполагаемите от нас релации; да докажем нашите концепции; да установим диагностичната чувствителност и специфичност на използваните от нас методи и да докажем предиктивната стойност на изследваните от нас биомаркери при оценка на риска от съдов инцидент при пациентите на хемодиализа.

Изследвали сме 120 пациенти в V стадий на хронична бъбречна недостатъчност на хемодиализа. Проследявани са в хода на една календарна година. От тях 29 пациента са със диабет, а 33 са с артериална хипертония. За периода на проучването са починали 16 пациента: 11 от инфаркт на миокарда и 5 от мозъчно- съдова болест.

1. Резултати от изследваните методи

1.1 Верифициране на метода за определяне на Хомоцистеин

За реализацията на проучването трябваше да въведем достатъчно чувствителен и специфичен метод за определяне на хомоцистеин в серум. Методът трябва да е достъпен и приложим, без да изисква допълнително апаратно оборудване. За определяне на концентрацията на хомоцистеин е използван ин витро тест за количествено определяне на тотален L – хомоцистеин в човешки серум в система на Roche – Cobas Integra 400.

Верифициране на метода за определяне на хомоцистеин е извършено съгласно препоръките на CLSI - EP. Съгласно тези препоръки на верифициране подлежат аналитични методи, които се изпълняват с реактиви, калибратори, контроли и апарати на производителя. Потвърждават се следните аналитични характеристики: аналитичен обхват (линейност), възпроизводимост, достоверност, референтни интервали.

а/ Аналитичен обхват

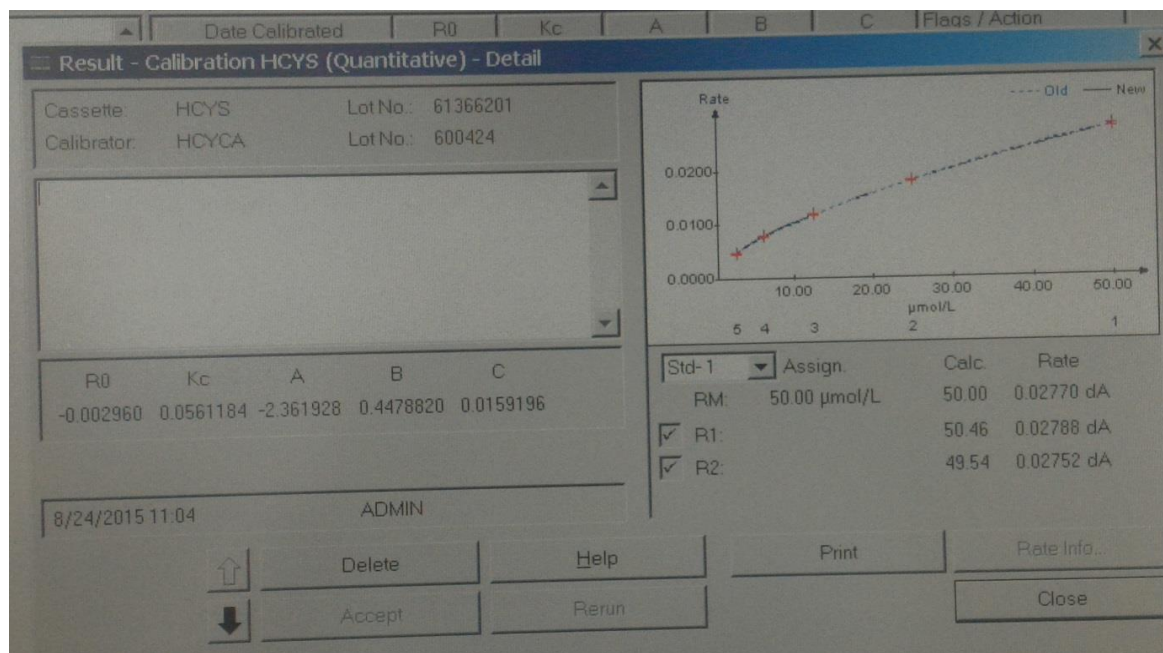
Калибрацията се извършва със стандартизиран референтен материал SRM - Lot № 600424 на CLSI, който е от висок метрологичен клас. Използван е стандарт със стойност 50 $\mu\text{mol/L}$. Автоматично се извършват следните разреждания 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:18 с 0.9 % натриев хлорид. Всички точки са определени двукратно. При верифициране на метода установихме, че калибрационната крива е линейна в границите от 3 до 50 $\mu\text{mol/L}$ (Фиг.1).

За потвърждаване на калибрационната крива сме определили LLOQ и ULOQ чрез петкратни определяния на първата и най- високата калибрационни точки. Изчислили сме mean, sd и CVи d% (табл.2). За LLOQ се получиха: mean = 3,14 $\mu\text{mol/L}$, CV - 11%, d% - 12,9, което е в съответствие

с международните изиквания – CV и bias до 20%. За ULOQ резултатите са: mean = 50,9 $\mu\text{mol/L}$, CV 2%, d% 1,84, което е в съответствие с международните изиквания – CV и bias до 15%.

Табл.2 Резултати от определяне на LLOQ и ULOQ

	n	mean	SD	CV%	D%(bias)
LLOQ	5	3,14	0,35	11%	12,90%
ULOQ	5	50,90	1,06	2%	1,84%



Фиг.1 Калибрационна крива на хомоцистеин

б/ Невъзпроизводимост и недостоверност в серия

Оценена е невъзпроизводимост в серия $n = 20$ с помощта на контролни материали LOT № 600 425- 01. В рамките на един ден са анализирани 20 контроли от две концентрационни нива (Control 1, target value = 12.4 $\mu\text{mol/L}$ и Control 2, target value = 36.5 $\mu\text{mol/L}$), които са оценени по съответните калибрационни криви. Резултатите са представени в таблица №3.

Недостоверността е оценена чрез отклонението bias% на получената средна стойност от прицелната стойност. Резултатите от оценката на невъзпроизводимостта и недостоверността са представени в табл №3. Изчислена е чрез сравнение на съответните получени стойности с номиналните концентрации и отговаря на възприетите критерии и изисквания. Според производителя контролният ранг се калкулира от прицелната стойност $\pm 18\%$, за Control 1 и за Control 2 – прицелна стойност $\pm 15\%$. От табл. 3 се вижда, че нашите резултати съответстват на препоръките на производителя.

Таблица 3: Хомоцистеин - невъзпроизводимост и недостоверност в непрекъснатата серия

Контролен материал	n	Target value $\mu\text{mol/L}$	mean $\mu\text{mol/L}$	SD	CV%	Bias%
Control 1	20	12.4	12.36	0.2	1.4	0.32
Control 2	20	36.5	36.4	0.18	2.3	0.27

в/ Невъзпроизводимост и недостоверност във времето

В рамките на 20 дни са анализирани по една контрола от две концентрационни нива (Control 1 target value = 12.4 $\mu\text{mol/L}$ и Control 2 target value = 36.5 $\mu\text{mol/L}$), които са оценени по съответните калибрационни криви. Получените резултати за невъзпроизводимост са представени в таблица № 4.

Недостоверността на резултатите е оценена по два начина: като отклонение от прицелната стойност на контролните материали и чрез метода на стандартната добавка и определяне на аналитичната откриваемост (recovery). Препоръчаните отклонения от прицелната стойност от производителя са за Control 1 $\pm 18\%$, а за Control 2 $\pm 15\%$ за всички анализатори на Roche. Нашите резултати попадат в тези граници.

Таблица 4: Хомоцистеин - невъзпроизводимост и недостоверност във времето

Контролен материал	n	Target value $\mu\text{mol/L}$	mean $\mu\text{mol/L}$	SD	CV%	Bias%
Control 1	20	12.4	12.52	0.3	2.1	-0.97
Control 2	20	36.5	36.42	0.8	2.0	0.22

г/ Достоверност

За определяне на достоверността е използван методът на аналитична откриваемост (% recovery). Бяха определени 5 проби с измерени концентрации за Нсу със стойности 5.9, 9.4, 11,21.7 и 28.8 $\mu\text{mol/L}$, както и една проба с измерена концентрация 50 $\mu\text{mol/L}$. На база измерените първоначални стойности, бяха изчислени очакваните стойности след

добавяне на 10% от високата проба. Беше изчислена средната откриваемост(табл.5).

Табл.5 Нсу аналитична откриваемост

Проба	Нсу (получена стойност) μmol/L	Нсу (измерена концентрация) μmol/L	% аналитична откриваемост
50	50.0	-	-
5.9	5.9	9.9	94.7%
9.4	9.4	13.3	98.5%
11	11.0	15.0	96.5%
21.7	21.7	25.8	98.0%
28.8	28.8	32.0	95.9%

Средна аналитична откриваемост: 96.7%

д/ Референтни граници

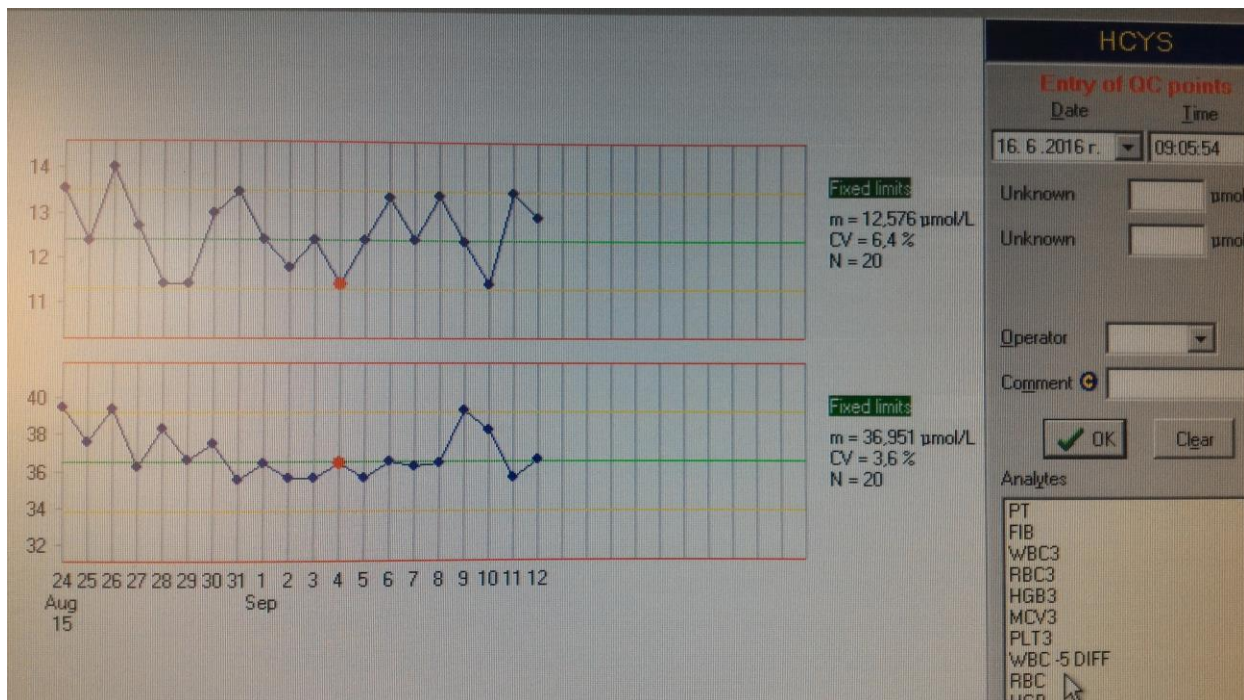
За верифициране на референтните интервали са приложени изискванията на CLSI. Бяха подбрани 20 здрави лица според препоръките на IFCC. Само 2 от получените стойности бяха по- високи от cut off използван от американските лаборатории за възрастни 15μmol/L (според производителя на реактива, Roche). Това ни даде основание ние да изберем за нашето проучване cut off 15 μmol/L. На табл. 6 са представени референтни интервали за хомоцистеин, според различни автори, вкл. и за българското население.

Таблица 6: Референтни интервали за хомоцистеин според различни автори

Автор	Година	Референтни стойности	Страна
Rasmussen	1996г.	жени и мъже до 11.9 $\mu\text{mol/l}$	Дания
Joosten	1996г.	жени и мъже до 12.7 $\mu\text{mol/l}$	Белгия, Германия, Холандия
Nygård	1998г.	жени до 12.6 $\mu\text{mol/l}$ мъже до 14,5 $\mu\text{mol/l}$	Норвегия
Ubbink	2000г.	жени и мъже до 11.7 $\mu\text{mol/l}$	Южна Африка
V Ganji	2006г.	бяла раса до 8.39 $\mu\text{mol/l}$, афроамериканци до 8.92 $\mu\text{mol/l}$, мексикански американци или испанци до 8.12 $\mu\text{mol/l}$	Северна Америка
Ангелова	2007г.	жени до 15.88 $\mu\text{mol/l}$, мъже до 19.5 $\mu\text{mol / l}$	България
Hyun Ja Kim	2010г.	мъже до 11.2 $\mu\text{mol / l}$ жени до 8.7 $\mu\text{mol / l}$	Корея

е/ Качествен контрол

По време на изследване на хомоцистеин в нашата лаборатория беше провеждан ежедневен вътрелaborаторен качествен контрол в две нива. Levey-Jennings графиките от вътрелaborаторния качествен контрол за хомоцистеин са представени на фиг.2.



Фиг. 2 Levey-Jennings графики на вътрелабораторен качествен контрол за Hcys

1.2 Сравнение на ензимния метод за определяне на креатинин с метода на Jaffe.

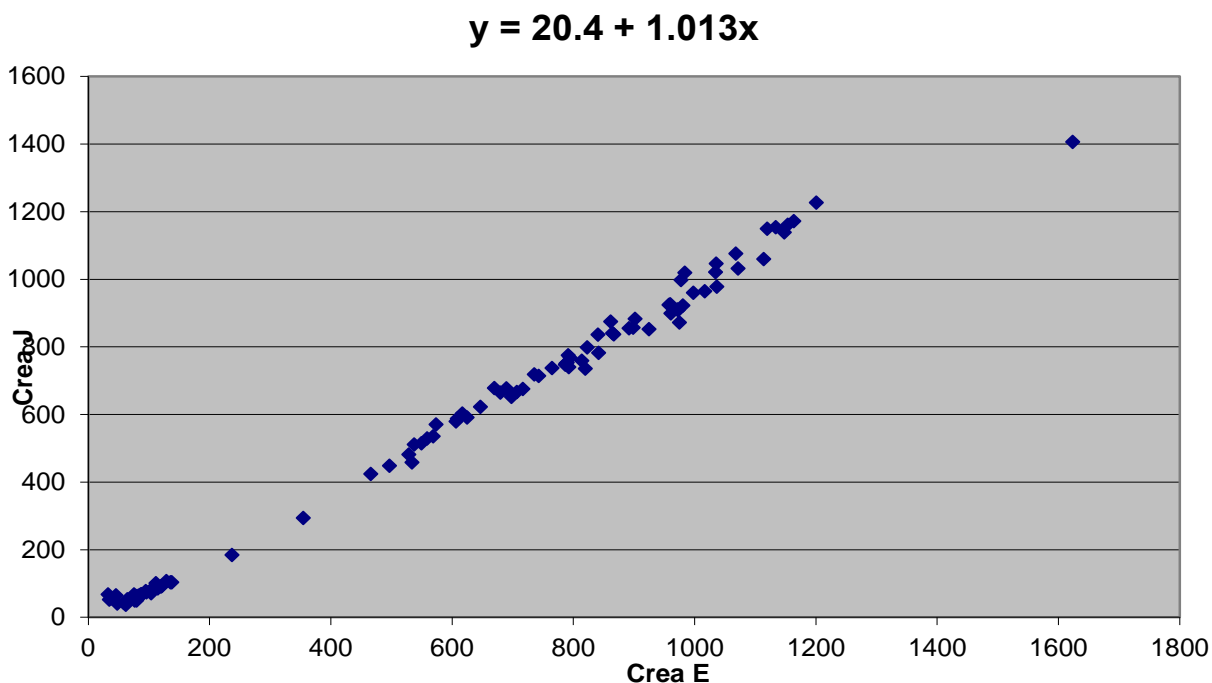
Оценката на двата метода за определяне на креатинин в хода на нашето проучване се наложи от факта, че креатининът и понастоящем е най - широко използваният маркер за оценка на бъбречната функция и за оценка степента на бъбречна увреда при пациентите на хемодиализа. Рутинно използван в клиничната лаборатория метод за определяне на креатинин е кинетичния метод на Jaffe. Въпреки широкото използване на този метод са докладвани случаи, при които върху реакцията на Jaffe може да се повлияе. Ензимният метод е един от най-точните рутинни методи за определяне на креатинин. Редица проучвания потвърждават, че този метод е подходящ като рутинен метод за измерване нивата на серумния креатинин в клиничната лаборатория, тъй като не се повлиява от интерфериращи вещества, но той е по-скъп. За да

установим има ли разлики между двата метода, ние сравнихме кинетичния и ензимния метод. И двата метода са напълно автоматизирани. Определяхме ги с реактиви на Roche на биохимичен анализатор Cobas Integra 400. И двата метода са с висока аналитична чувствителност и са стандартизирани спрямо ID/MS метода.

С цел верифициране достоверността на резултатите за креатини на пациенти получени с кинетичния метод на Jaffe, извършихме сравнително проучване с многостъпален ензимен метод.

Изследвани са 104 серумни проби по двата метода. По време на сравнителните проучвания е извършван ежедневен вътрелабораторен качествен контрол в две нива - нормални и патологични (Precicontrol ClinChem Multi 1, lot № 174 787-04 и Precicontrol ClinChem Multi 2, lot № 174 801-02).

Резултатите са обработени статистически чрез корелационен и регресионен анализ. Открита е висока корелация между двата метода за креатинин, като се потвърди, че резултатите за креатинин измерени с ензимния метод са по –ниски, сравнени с резултатите измерени с кинетичния метод на Jaffe (фиг. 3).



Фиг. 3 Корелация между ензимния и кинетичен метод на Яфе за креатинин

2. Определяне на диагностичната надежност на хомоцистеина и други лабораторни показатели

2.1 Определяне на диагностичната специфичност и чувствителност на хомоцистеина и на други биохимични показатели спрямо съдов инцидент чрез ROC криви

Диагностичните качества на изследваните биохимични показатели са оценени чрез ROC криви, базирани върху чувствителността и специфичността на тестовете.

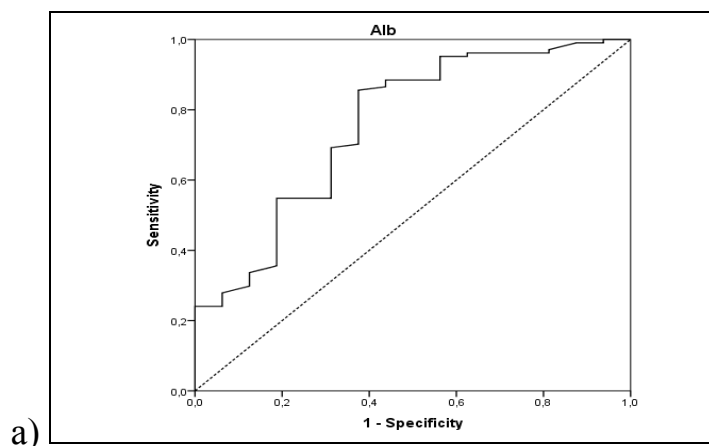
За всяка от наблюдаваните стойности на биохимичния показател е изчислена чувствителност и специфичност. Праговите значения, за които показателите имат най-висока чувствителност и специфичност, са показани на табл.7

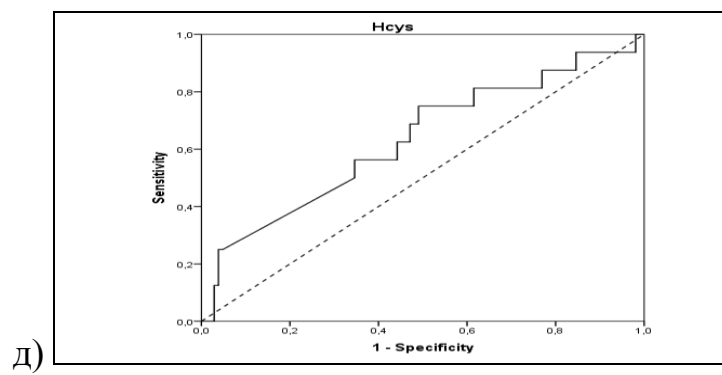
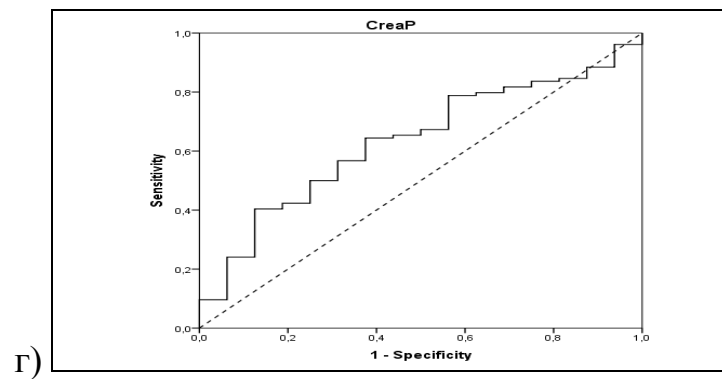
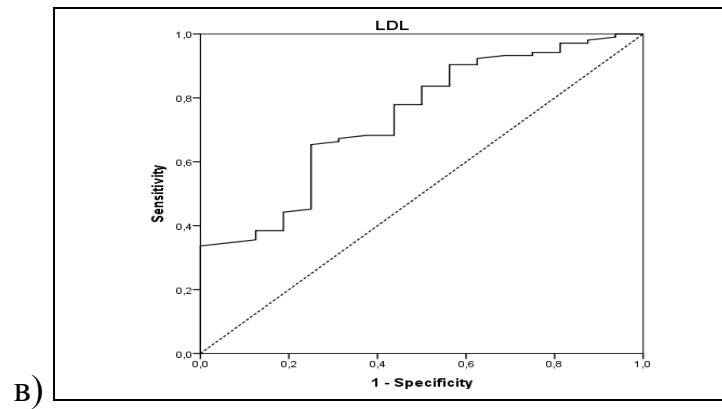
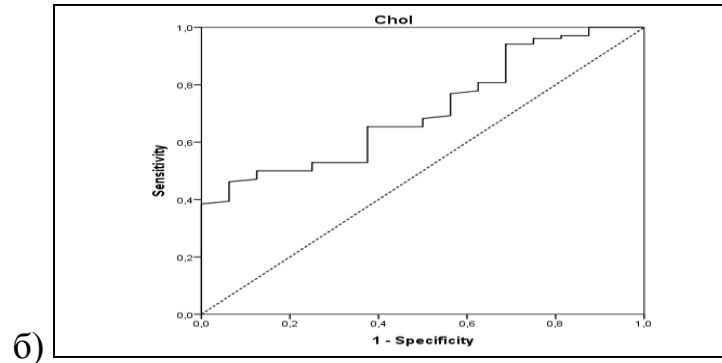
Табл.7 Прагови стойности на отделни показатели

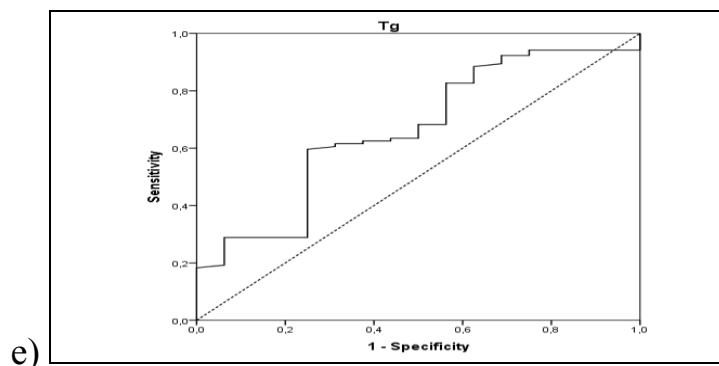
Показатели	Прагови стойности	Чувствителност, %	Специфичност, %
Албумин	$\leq 37,2$	69,2	68,8
LDL	$\leq 2,08$	66,3	68,8
Холестерол	$\leq 3,97$	65,4	62,5
Триглицериди	$\leq 1,40$	62,5	62,5
Креатинин	$\leq 720,00$	64,4	66,3
Хомоцистеин	$\geq 47,30$	62,5	55,8

Двойките от кореспондиращите си числа за чувствителност и специфичност на дадения показател са отразени като точки на правоъгълна координатна система. При тяхното съединяване се получава начупена линия, наречена ROC крива (фиг.4). Площта под нея е мярка за това, до каква степен по стойностите на биохимичния показател пациентите в извадката могат да се класифицират в една от двете групи: болни/здрави.

На фиг. 4 са представени ROC кривите на 6-те биохимични показатели с по-важна диагностична роля при определяне риска от съдов инцидент при изследваните пациенти, а именно кривите на: албумин (а),холестерол (б), LDL(в), креатинин(г), хомоцистеин (д), триглицериди (е).







Фиг. 4 ROC криви на биохимични показатели спрямо съдов инцидент

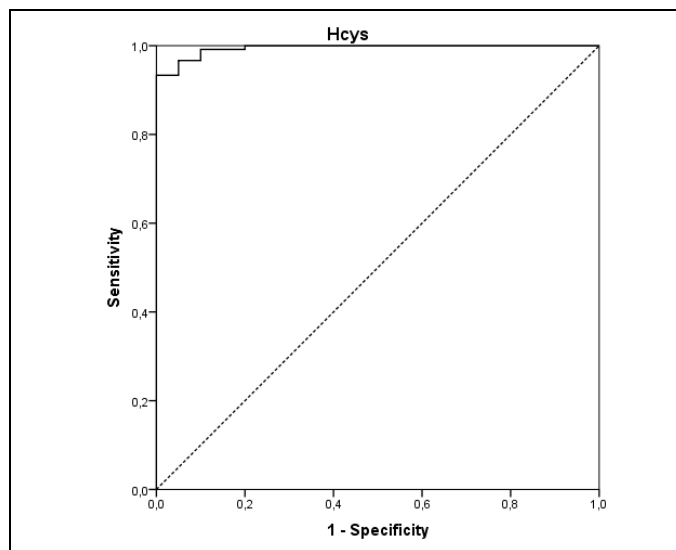
Коефициентите за AUC (Area under the curve) са представени на табл.8. За показателите: холестерол, LDL, албумин и триглицериди той е значим ($p < 0,05$) и надхвърля 0,66, т.е. с всеки от тях може правилно да се разграничи болни от здрави в 66%.

Табл. 8 AUC - коефициенти по отношение на риска от съдов инцидент

Показател	AUC	SE	p	95% Доверителен интервал	
Ca	0,569	0,072	0,373	0,429	0,710
P	0,546	0,079	0,557	0,391	0,700
Mg	0,633	0,081	0,087	0,475	0,792
Fe	0,627	0,074	0,103	0,481	0,773
TIBC	0,638	0,072	0,077	0,497	0,779
Tg	0,664	0,072	0,035	0,523	0,804
Chol	0,710	0,060	0,007	0,593	0,828
HDL	0,520	0,080	0,799	0,363	0,677
LDL	0,739	0,064	0,002	0,614	0,864
Urea	0,533	0,071	0,668	0,395	0,672
Alb	0,757	0,070	0,001	0,620	0,893
UA	0,516	0,073	0,841	0,372	0,659
CRPhs	0,623	0,080	0,115	0,466	0,779
CreaP	0,633	0,067	0,087	0,501	0,766
Hcys	0,632	0,080	0,089	0,476	0,788
K	0,577	0,072	0,323	0,436	0,718

Висока е диагностична стойност на креатенинът и хомоцистеинът. Техните Р значения (съответно: 0,087 и 0,089) са по-големи от критичната точка 0,05, но са по-малки от 0,10: най-голямото ниво на значимост, което също се прилага (макар и по-рядко) в биостатистическите проучвания. При това условие хомоцистеинът, който е обект на по-разширено и задълбочено изучаване, може да се използва като диагностичен тест за оценка риска от съдов инцидент. За него $AUC = 0,632$ с 95% ДИ= $0,476 \div 0,788$. Праговите му значения са $\geq 47,30$, което определя чувствителност = 62,5% и специфичност = 55,8% (табл.7).

Диагностичната стойност на хомоцистеина е особено голяма по отношение на 2 категории – пациентите на диализно лечение и здрави контроли. Съответната ROC крива е представена на фиг.5.



Фиг.5 ROC крива на хомоцистеина при диализно лечение и контроли

Коефициентът AUC е равен на 0,994 ($p = 0,000$) с 95% ДИ = $0,985 \div 1,000$. Т.е. хомоцистеинът практически в 100% правилно диагностицира групата от 140 лица на 2 категории: 120 – на хемодиализа и 20 – контроли.

Всички пациенти на хемодиализно лечение са с повишени серумни нива на хомоцистеин. Праговите значения са $\geq 15,30$, които дефинират чувствителност = 99,2% и специфичност = 90,0%. Тези резултати подкрепят тезата за диагностичната стойност на хомоцистеина при пациентите на хемодиализа.

2.2 Разпределения на групи от пациенти по значенията на хомоцистеина

Този раздел е разработен специално за хомоцистеина главно по две причини. Първо, счита се, че той е с първостепенна роля при определяне на риска от възникване и развитие на съдов инцидент и ако това е така, задължително следва да се изяснят честотните разпределения на различни пациентски групи спрямо този показател. Второ, липсва системно изследване в тази област.

Анализът е проведен поотделно за 1-ва и 6-та визита и обхваща следните групи: изходната извадка от 120 пациенти – общо, по пол и възраст; пациенти със захарен диабет – общо, по пол и възраст; пациенти с артериална хипертония – общо, по пол и възраст; пациенти прекарвали съдов инцидент (инфаркт или инсулт) в хода на проучването.

Изследването се представя в 4 насоки:

1. Графично представяне на честотни разпределения.

Данните за честотните разпределения на пациентите по отношение на хомоцистеина са отразени в графична форма, съчетани с някои по-обща статистически величини, произтичащи от групировката на стойностите му.

2. Установяване на формата на честотните разпределения.

Използва се критерият на Колмогоров – Смирнов (Z) за доказване на нормалност на разпределенията за хомоцистеина.

3. Основни обобщаващи характеристики на честотните разпределения при хомоцистеина.

Използвали сме средната аритметична стойност (X_{cp}), когато формата на разпределение наподобява нормална крива или медианата (Me), когато разпределението не е нормално. Чрез тези мерки характеризираме сходството на пациентите спрямо хомоцистеина. Получените обобщени величини са особено важни и при сравнителния анализ по пол, възраст и диагнози. Степента на различието между индивидуалните значения на хомоцистеина оценяваме чрез стандартното отклонение (SD) и коефициента на вариация ($CV\%$). Приемаме, че вариацията на стойностите на хомоцистеина в дадена група от пациенти е относително ниска, ако $CV < 30\%$; от средна степен, ако $CV = 30 - 50\%$; и висока, ако $CV > 50\%$.

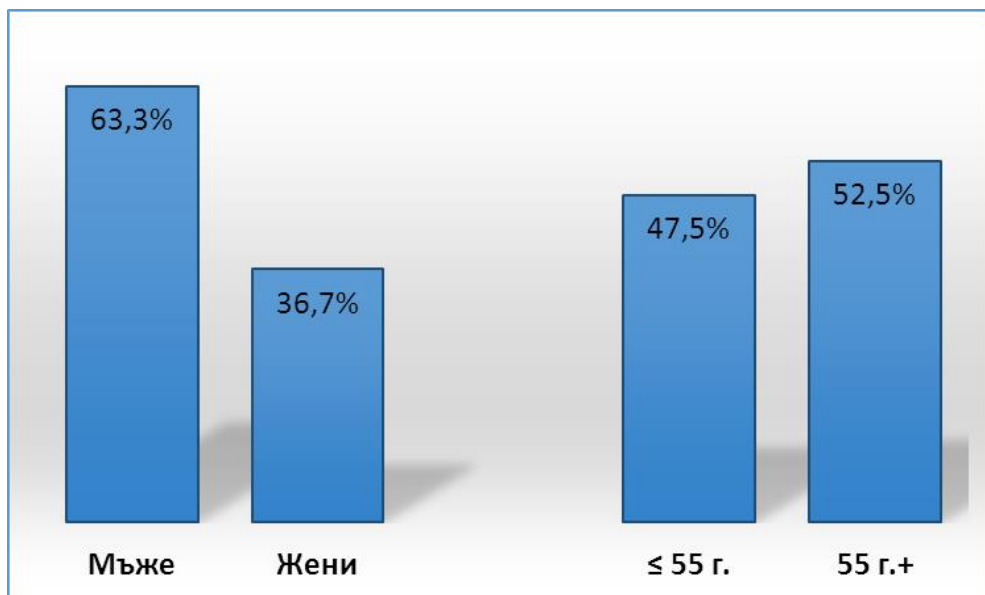
4. Доверителни интервали

Доверителният интервал (ДИ) ни позволява да анализираме средната стойност получена за хомоцистеин (X_{cp}) по данни от нашата извадка (120 пациенти на диализа), като я възприемаме за цялата изходна популация на пациентите - действителната средна стойност за всички пациенти с хронично бъбречно заболяване, стадий V на хемодиализа. Изчисленията за ДИ извършваме при доверителна вероятност $P_t = 95\%$. Средната стойност и доверителният интервал взети заедно осигуряват по-голяма плътност на информацията и говорят за ролята на случайността като алтернативно обяснение на статистическата валидност на получените оценки.

Доверителните интервали с известна условност могат да се прилагат и като оценъчен критерий – различията между две средни стойности (X_{cp}) на даден показател са статистически значими, ако съответните им доверителни интервали не се препокриват.

2.3 Оценка по възраст и пол

Разпределенията на 120 пациенти по пол и възраст (до 55 и над 55 год.) графично са отразени на фиг. 6.



Фиг. 6 Диаграма на разпределението на пациентите по пол и възраст

Относителният дял на мъжете (63,33%, 76 пациента) е значително по-висок ($P < 0,05$) от този на жените (36,66%, 44 пациентки), което свидетелства за по-широко разпространение на хроничната бъбречна недостатъчност сред мъжкия пол. Пациентите на възраст над 55 год. (63 бр.; 52,50%) са малко повече от пациентите на възраст до 55 год. (57 броя, 47,50%).

Честотните разпределения по възраст – общо за извадката, за мъжете и за жените, са нормални. Обобщаващите статистики за тях са отразени в табл.9.

Табл. 9. Обобщаващи статистики на пациентите по възраст

Възраст	N	X _{cp}	95% ДИ	Me	SD	CV%	X _{min}	X _{max}
Общо	120	56,93	54,68 ÷ 59,17	56,00	12,56	22,06	27,00	85,00
Мъже	76	55,62	52,97 ÷ 58,26	55,00	11,77	21,15	27,00	85,00
Жени	44	59,18	55,14 ÷ 63,22	60,50	13,67	23,09	34,00	81,00

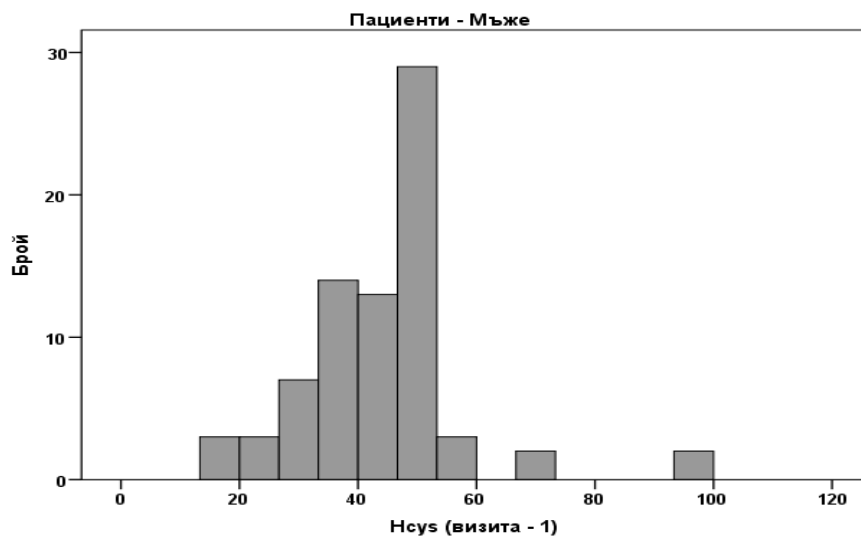
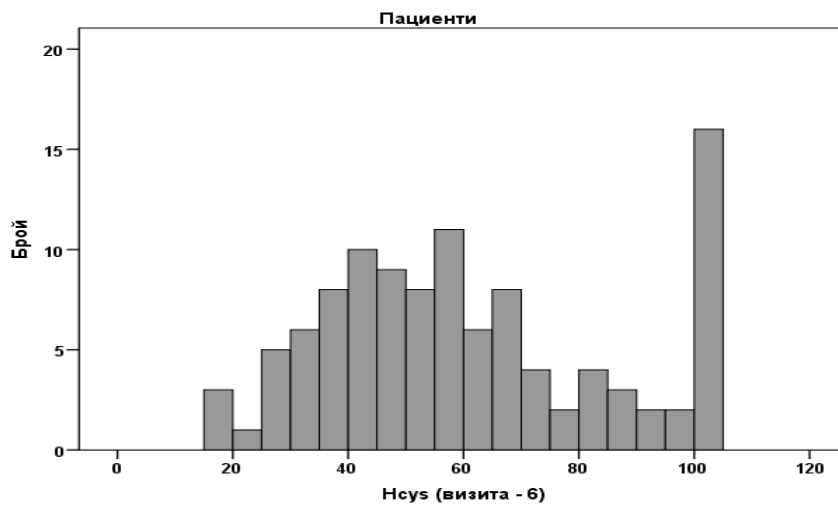
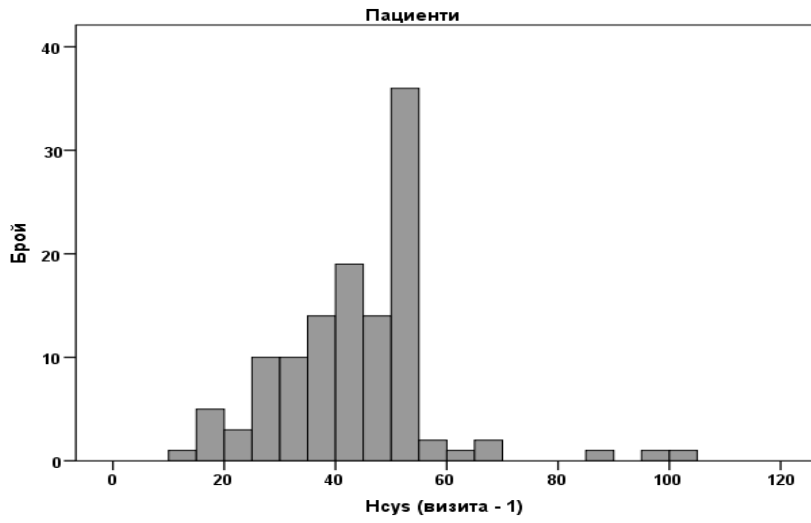
Средната възраст на пациентите (X_{cp}) е 57 год. с доверителен интервал от 55 до 59 години. За мъжете тя е 56 год. (ДИ = 53÷58), при жените е завишена – 59 години (ДИ = 55÷ 63). Възрастовата вариабилност, изразена с коефициента на вариация е ниска ($CV < 30\%$). За извадката като цяло е 22,06% ,за мъжете е 21,15%, а за жените 23,09%.

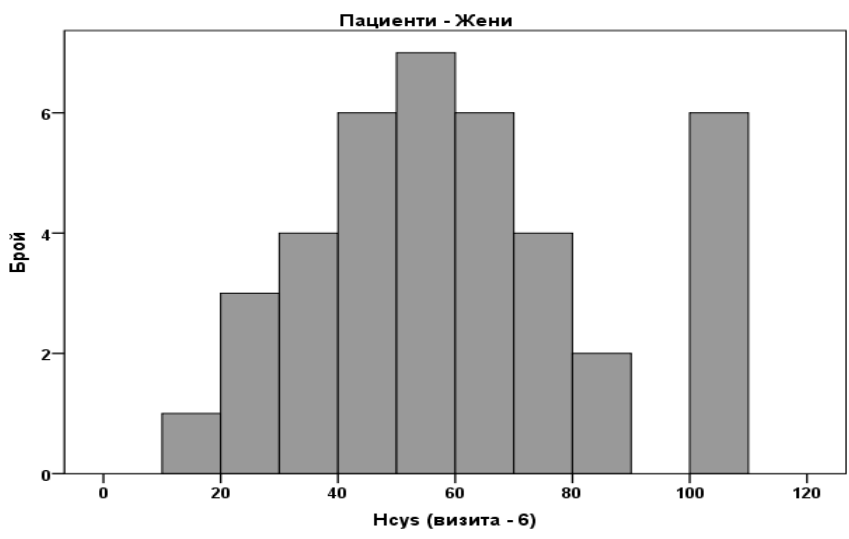
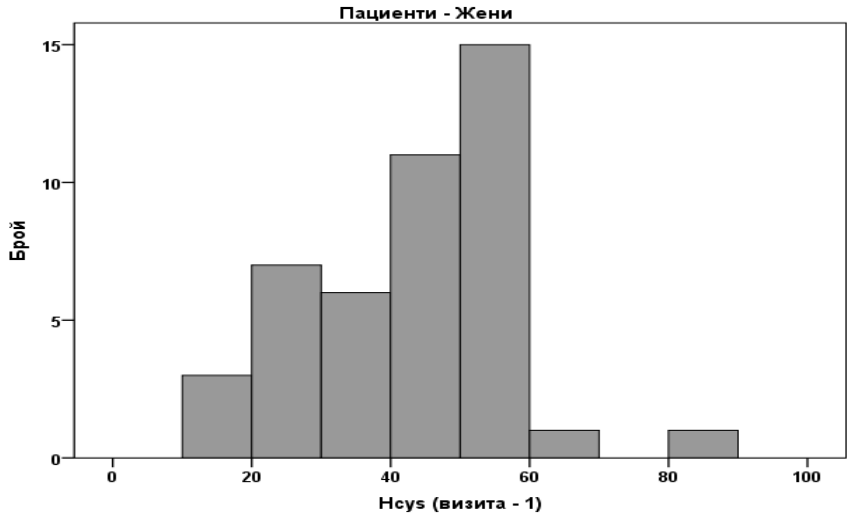
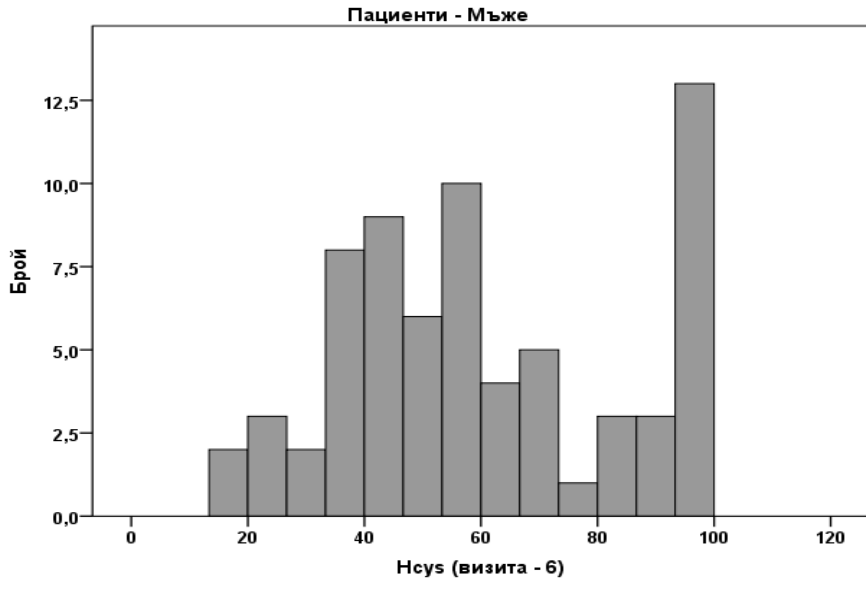
2.4 Разпределение на резултатите на пациентите спрямо хомоцистеин

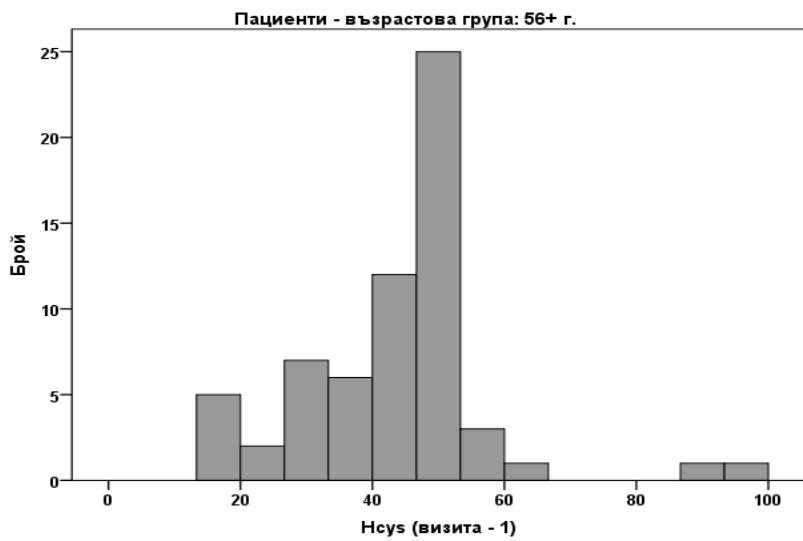
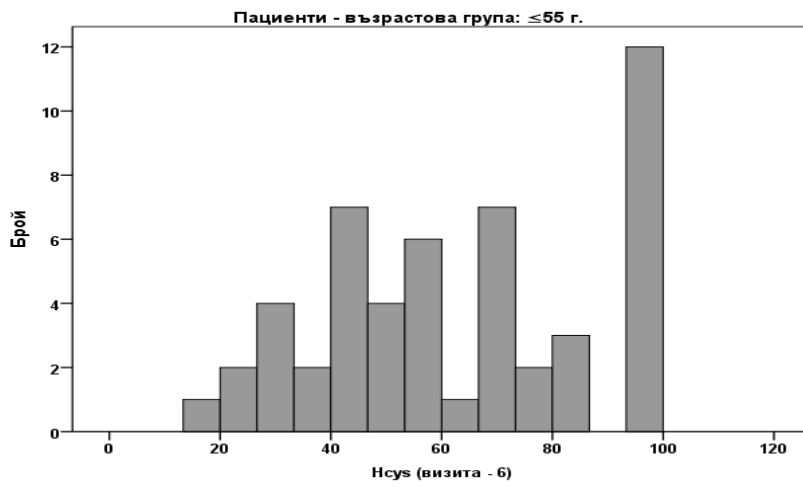
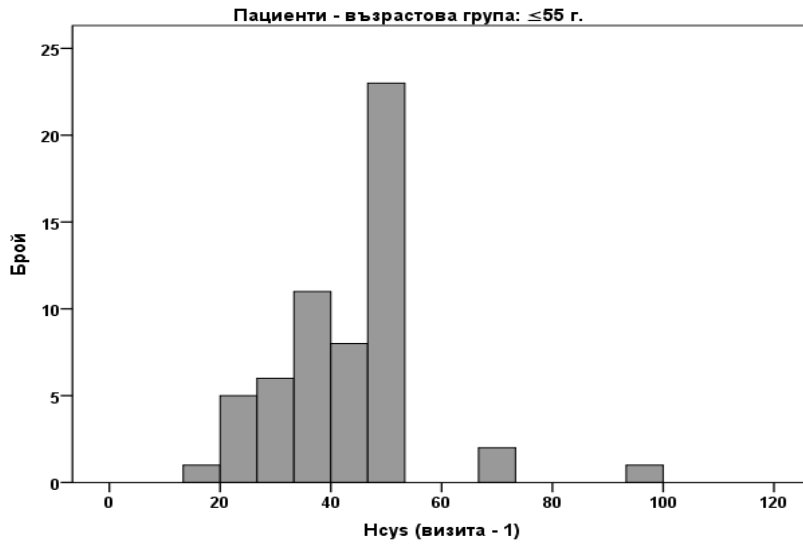
(Hcys) – общо, по пол и възраст

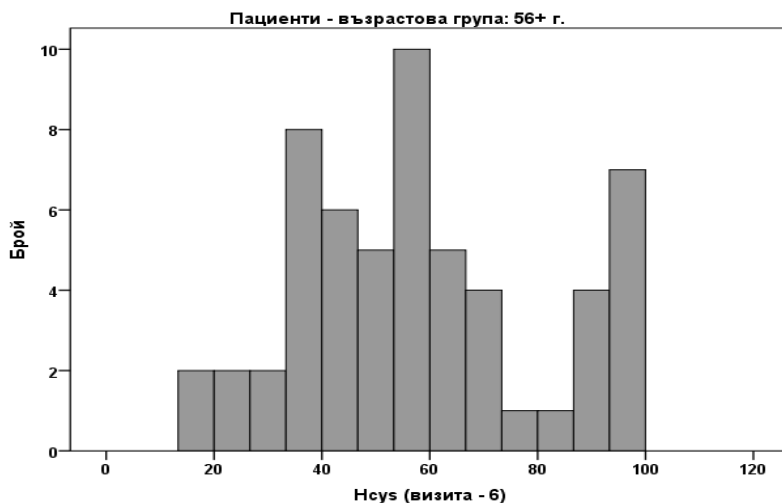
A. Графично представяне

Хистограмите на ч.р. (при 1-ва и 6-та диализа) са изобразени на фиг. 7: за изходната извадка, за мъжете, за жените, за възрастта до 55 год. и за възрастта над 55 год. Честотните разпределения при 1-ва визита по форма съществено се различават от нормалната крива ($p < 0,05$), а при 6-та визита, обратно - те са нормални ($p > 0,05$).









Фиг. 7. Хистограми на честотно разпределение на различни групи от пациенти по Hcys

Б. Обобщаващи данни

Обобщаващите характеристики на разпределение по Hcys: общо, по пол и възраст, са отразени на табл. 10.

Табл. 11. Обобщаващи статистики по Hcys- общо, по пол и възраст

Визита	Група	N	Hcys (μmol/L)							
			Хср	95% ДИ	Ме	Мо	SD	CV%	Xmin	Xmax
1-ва	Общо	120	43,23	40,81 ÷ 45,66	44,20	50,00	13,55	31,34	14,13	100,00
	Мъже	76	44,15	41,08 ÷ 47,22	44,55	50,00	13,65	30,92	15,51	100,00
	Жени	44	41,65	37,69 ÷ 45,6	43,26	50,00	13,38	32,13	14,13	87,00
	≤ 55 г.	57	43,06	39,72 ÷ 46,4	43,34	50,00	12,86	29,87	18,18	100,00
	55 г.+	63	43,40	39,88 ÷ 46,91	44,70	50,00	14,25	32,83	14,13	98,50
6-та	Общо	108	60,78	56,2 ÷ 65,35	57,43	100,00	24,26	39,92	15,51	100,00
	Мъже	69	60,84	54,99 ÷ 66,7	56,44	100,00	24,81	40,77	15,51	100,00
	Жени	39	60,66	53,25 ÷ 68,06	59,02	100,00	23,59	38,90	18,58	100,00
	≤ 55 г.	51	63,48	56,49 ÷ 70,46	59,87	100,00	25,45	40,09	17,66	100,00
	55 г.+	57	58,36	52,36 ÷ 64,36	55,04	100,00	23,11	39,60	15,51	100,00

От нея се виждат:

а) Средни стойности.

Средната стойност за хомоцистеина, за изходната извадка от 120 пациенти при 1-вата визита е 43,23 $\mu\text{mol/L}$ с доверителен интервал от 40,81 $\mu\text{mol/L}$ до 45,66 $\mu\text{mol/L}$. При 6-та визита, средните стойности за изходната извадка вече са по-големи: $X_{\text{cp}} = 60,78 \mu\text{mol/L}$, $Me = 57,43 \mu\text{mol/L}$. По-високи са и средните стойности на хомоцистеина в отделните групи (по пол и възраст).

б) Стойностите с най-голяма честота - мода

За всички групи стойностите с най – голяма честота за хомоцистеин е една и съща: 50 $\mu\text{mol/L}$ в началото и 2 пъти по-голяма в края на проучването: 100 $\mu\text{mol/L}$.

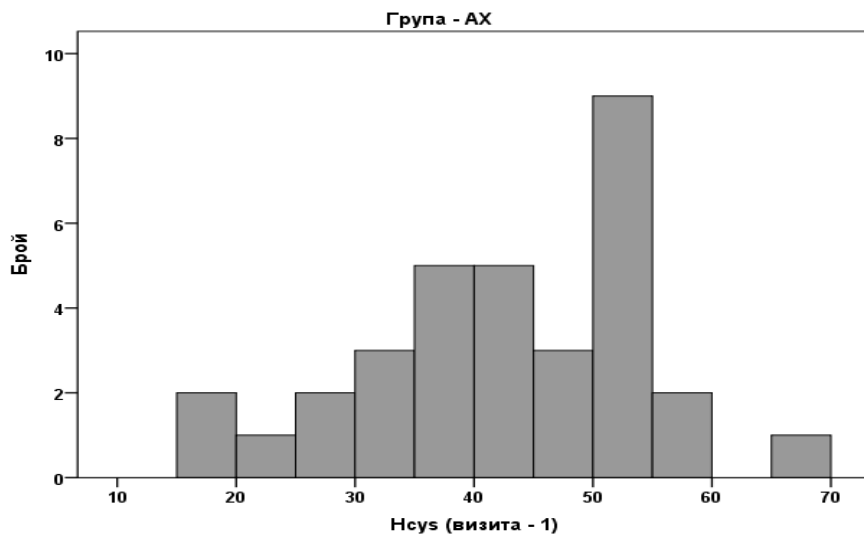
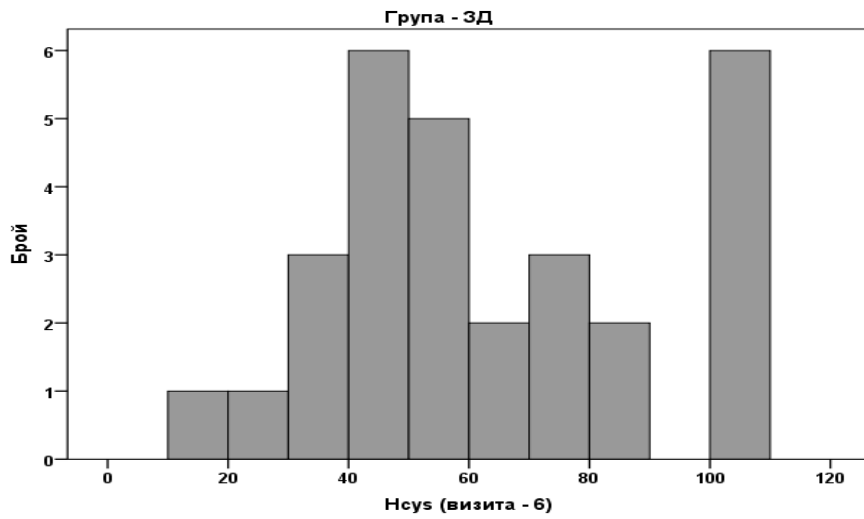
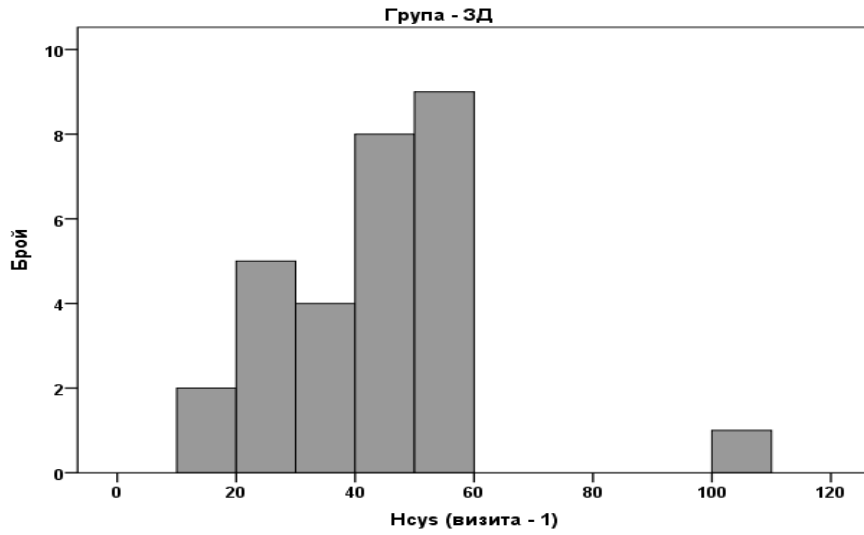
в) Коефициентът на вариация (CV%).

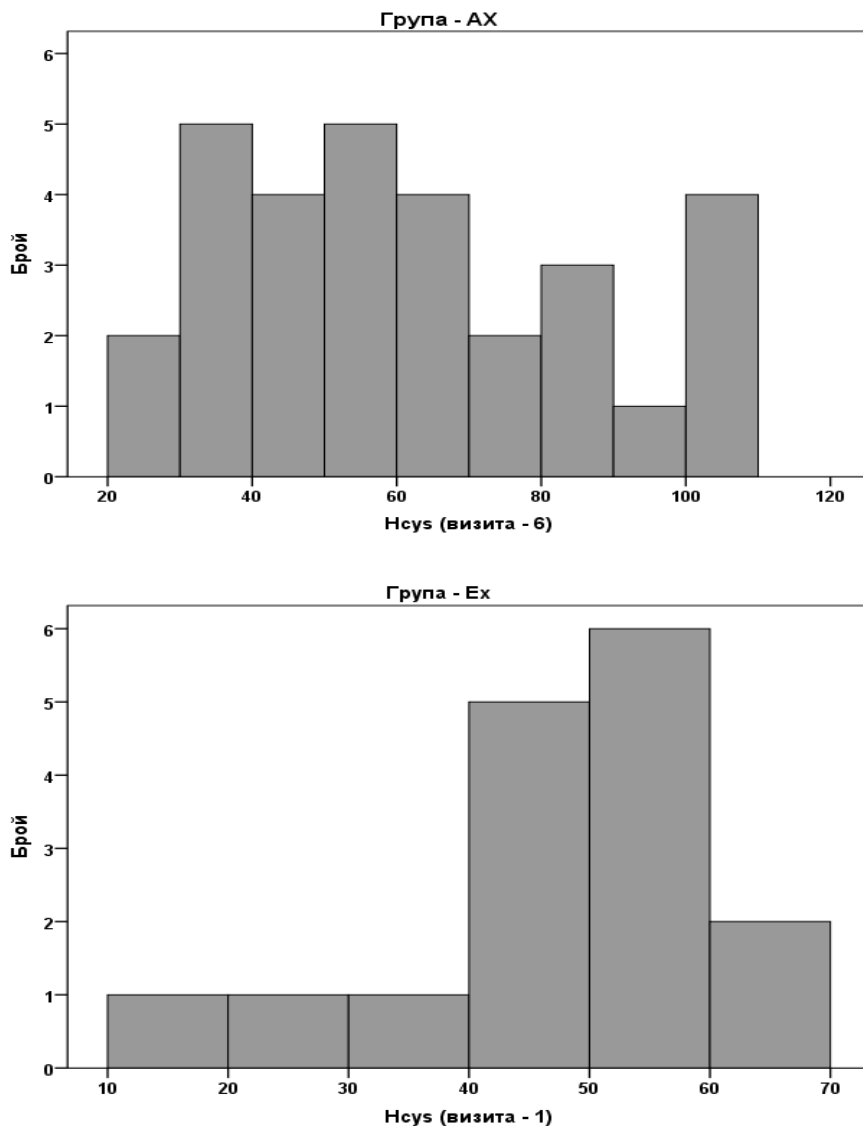
Стойностите му са относително ниски: под 33% за 1-вата визита и под 40% за 6-тата визита. Т.е. налице е относителна еднородност на пациентите в отделните групи по значенията на хомоцистеина.

Вижда се, че всички обобщаващи статистически характеристики на честотно разпределение на пациентите на хемодиализа за 6-тата визита са значително по-високи спрямо 1-вата.

2.5 Нсуs при пациенти със захарен диабет (ЗД), артериална хипертония(АХ) и прекаран фатален съдов инцидент(Е_x)

Хистограмите на честотно разпределение са отразени на фиг. 8*: (а) и (б) – за ЗД, 1-ва и 6-та визита; (в) и (г) – за АХ, 1-ва и 6-та визита; (д)– за съдов инцидент Е_x, 1-ва визита.





Фиг. 8 Хистограми на честотно разпределение за хомоцистеин при пациенти със ЗД, АХ и Е_х

Съдовия инцидент (Е_х) е включен в графичното представяне. Честотните разпределения по форма са, както следва:

- Нормални ($p > 0,05$) – за пациентите с АХ (1-ва визита) и за всички групи при 6-та визита;
- асиметрични ($p < 0,05$) - за пациентите със ЗД и Е_х, 1-ва визита.

Обобщаващите статистически характеристики на честотно разпределение за H_{cys} при пациенти със ЗД, АХ и съдов инцидент E_x са представени на табл. 11.

Табл. 11. Обобщаващи статистики за H_{cys} при ЗД, АХ и съдов инцидент E_x

Заболяване	Диализа		N	Хомоцистеин		Me	SD	V%	Xmin	Xmax
				Хср	95% ДИ					
ЗД	1-ва	Не	91	43,64	40,95 ÷ 46,33	44,70	13,08	29,98	14,13	98,50
		Да	29	41,97	36,47 ÷ 47,47	41,94	15,11	36,00	18,18	100,00
	6-та	Не	79	60,10	54,79 ÷ 65,41	57,26	24,09	40,09	15,51	100,00
		Да	29	62,62	53,5 ÷ 71,74	59,02	25,07	40,03	17,66	100,00
АХ	1-ва	Не	87	43,63	40,62 ÷ 46,63	44,70	14,30	32,78	14,13	100,00
		Да	33	42,20	38,29 ÷ 46,12	41,94	11,48	27,19	16,42	68,75
	6-та	Не	78	60,44	54,98 ÷ 65,9	55,75	24,61	40,71	15,51	100,00
		Да	30	61,66	53,16 ÷ 70,15	59,01	23,74	38,51	26,24	100,00
E_x	1-ва	Не	104	42,63	40,03 ÷ 45,24	42,88	13,55	31,77	14,13	100,00
		Да	16	47,13	40,59 ÷ 53,67	49,86	13,34	28,31	15,78	68,75

Средни стойности за хомоцистеин са разположени в широк интервал: при ЗД – от 41,97 $\mu\text{mol/L}$ (при 1-ва визита) до 62,62 $\mu\text{mol/L}$ (при 6-та визита); при АХ – от 42,20 $\mu\text{mol/L}$ (при 1-ва визита) до 61,65 $\mu\text{mol/L}$ при (6-та визита). Докато различието между средните стойности на хомоцистеина по визити е доста чувствително, то разликата по диагноза (ЗД - АХ) е незначителна.

И за двете заболявания (ЗД и АХ) стойностите с най –голяма честота са едни и същи – 50 $\mu\text{mol/L}$ при 1-ва визита и 2 пъти по-високи при 6-та – 100 $\mu\text{mol/L}$.

Обобщаващите статистики за Hcys при пациенти със съдов инцидент (Ex) са определени за 1-ва визита. В случая не се оценява „диагностичния“ ефект на Hcys, а по-скоро се дава потенциален отговор за наличие на ефект.

За коефициента на вариация стойностите са от средна степен: $36 \div 40\%$ при захарен диабет и $27 \div 39\%$ при артериална хипертония.

За част от разглежданите пациентски групи разпределенията по хомоцистеин са нормални ($p > 0,05$), а останалите – абнормални ($p < 0,05$). Въпреки установената асиметричност, статистическата вариация на индивидуалните значения на хомоцистеина е от ниска или умерена степен. Средните величини са доста близки помежду си в рамките на отделната диализа, като съществено се повишават при 6-тата спрямо 1-вата визита. Докато средните стойности на хомоцистеина при пациентите със захарен диабет и хипертония са приблизително равни – $42 \mu\text{mol/L}$, то средната стойност на хомоцистеина за пациентите със съдов инцидент е по-висока (и то още при първа визита) – $47 \mu\text{mol/L}$.

В сравнителен план, за 6 от 11-те биохимични показатели се наблюдава повишаване на стойностите им при 6-та спрямо 1-ва визита: за Tg, LDL и Chol с повече от 8-10%; за Alb, HDL и K – 3-6%. При Hcys повишението е 40%.

2.6 Оценяване на различията между групи от пациенти по отношение на хомоцистеина

Сравнителният анализ по отношение на хомоцистеина е извършен за следните двойки от пациентските групи: мъже/ жени; възраст до 55 год. / над 56 год.; със ЗД/с АХ; със ЗД/със съдов инцидент; с АХ/със съдов инцидент.

С работната (нулевата) H_0 хипотеза е дефинирана статистическа незначимост на наблюдаваното различие между средните стойности на

хемоглобин при сравняваните групи. С алтернативната хипотеза (H_1) се твърди, че наблюдаваната разлика е статистически значима, т.е. обуславя се не само от действието на случайни причини, а преди всичко от закономерно действащи фактори. Решението за приемането или отхвърлянето на H_0 се основава на t – критерия при нормалните честотни разпределения или на критерия на Ман – Уитни (U) - за разпределения с форма далеч от нормалната крива, при ниво на значимост $\alpha = 0,05$. Рискът за неправилно отхвърляне на H_0 е малък – само 5%, но все пак е различен от нула, т.е. заключението винаги има вероятностен характер.

Резултатите от проверката (табл.12) показват, че различията между сравняваните групи по средните стойности на хемоглобин са статистически незначими ($p > 0,05$), както при 1-ва, така и при 6-та визита.

Табл. 12. Стойности на t и U за H_{scus}

Пациентски групи	tP_t	UP_u		
<u>1-ва визита</u>				
мъже – жени	-	-	1581	0,62
≤55 г. – 56 ⁺ г.	-	-	1717	0,68
Ех - ЗД	-	-	164	0,10
Ех – АХ	-	-	88	0,27
ЗД - АХ	0,60	0,98	-	-
Ех (да) – Ех (не)	-	-	612	0,09
<u>6-та визита</u>				
мъже – жени	0,04	0,97	-	-
≤55 г. – 56 ⁺ г.	1,10	0,28	-	-
ЗД - АХ	0,17	0,87	-	-

Коренно различни са резултатите от сравняванията (чрез доверителните интервали, (ДИ) на двете визити – начална и крайна.

Установено е статистически значимо нарастване на хомоцистеина при 6-та спрямо 1-ва визита ($p < 0,05$) за извадката като цяло и за всички групи поотделно. Табл. 13.

Табл. 13. Средни стойности и P- значения на разликите при Hcys

Сравнявани групи	Средни стойности		P
	1 визита	6 визита	
Общо	43,23	60,78	< 0,05
Мъже	44,15	60,84	< 0,05
Жени	41,65	60,68	< 0,05
Възраст <55 год.	43,06	63,48	< 0,05
Възраст \geq 55 год.	43,40	58,36	< 0,05
Пациенти със ЗД	41,97	62,62	< 0,05
Пациенти с АХ	42,20	61,65	< 0,05
Пациенти с Ех *	47,13	51,76	-

*Сравнението по отношение съдов инцидент(Ех) не е извършено поради малкия брой случаи с Ех при 6-та визита (5 сл.)

Статистически значима е и разликата в относителните дялове на пациентите със съдов инцидент в групите с хомоцистеин <50 и \geq 50 $\mu\text{mol/L}$ (7,8% и 44,44%).

Горните резултати на фона на динамиката на смъртните случаи вследствие съдов инцидент – инфаркт или инсулт (от 1-ва до 6-та визита) ни дават основание да твърдим, че хомоцистеинът определено има прогностично значение – с нарастване на стойностите му (от дадено ниво

нататък) заболяемостта и болничният леталитет в резултат на съдов инцидент се увеличават.

С подобна роля са и Tg, Chol, LDL и Alb. Установяваме статистическа значимост ($p < 0,05$) на различието между средните им стойности за пациенти с и без съдов инцидент (1-ва визита).

2.7 Анализ на статистически връзки на клинично-лабораторни показатели и на заболявания

С този анализ установяваме дали между определени показатели съществува или не съществува статистически значима връзка; оценява се нейната сила, когато вида и обема на данните го позволяват.

Chi квадрат методът и точният критерий на Фишер се прилагат съчетано с кростаблици за установяване на статистическа валидност на връзки между естествени или изкуствено създадени от нас за целите на анализа категорийни показатели, напр. за пациенти с артериална хипертония – 1 или 0, т.е. има или няма АХ, при нива на хомоцистеина: < 40 , $40-50$; > 50 $\mu\text{mol/L}$.

Посредством тези два метода проверяваме хипотезите за статистическа значимост на връзките между следните променливи: съдов инцидент – хомоцистеин (Hcys); съдов инцидент – холестерол (Chol); съдов инцидент – албумин (Alb); съдов инцидент – триглицериди (Tg); съдов инцидент – HDL холестерол (HDL); съдов инцидент – LDL холестерол (LDL); съдов инцидент – hsC-реактивен протеин (hs CRP); захарен диабет (ЗД) – хомоцистеин; артериална хипертония (АХ) – хомоцистеин; съдов инцидент – захарен диабет (ЗД); съдов инцидент – артериална хипертония (АХ);

Проверката се осъществява за 1-ва визита. (За 6-та визита данните в таблиците са само за предварителна илюстрация). Кростаблиците, и Р – значенията са посочени на табл. 14.

Табл. 14. Кростаблици и р-значения

Hcys		Визита - 1, (p=0,011)		Визита – 6	
		Ех		Ех	
		Не	Да	Не	Да
<40	Брой	40	3	21	2
	% по редове	93,0%	7,0%	91,3%	8,7%
	% по колони	38,5%	18,8%	20,4%	40,0%
40-50	Брой	59	9	19	0
	% по редове	86,8%	13,2%	100,0%	0,0%
	% по колони	56,7%	56,3%	18,4%	0,0%
>50	Брой	5	4	63	3
	% по редове	55,6%	44,4%	95,5%	4,5%
	% по колони	4,8%	25,0%	61,2%	60,0%
Chol		Визита - 1, (p=0,022)		Визита – 6	
		Ех		Ех	
		Не	Да	Не	Да
≤ 5.2	Брой	76	16	75	5
	% по редове	82,6%	17,4%	93,8%	6,3%
	% по колони	73,1%	100,0%	72,8%	100,0%
>5.2	Брой	28	0	28	0
	% по редове	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%
	% по колони	26,9%	0,0%	27,2%	0,0%
Alb		Визита - 1, (p<0,001)		Визита – 6	
		Ех		Ех	
		Не	Да	Не	Да
<35	Брой	16	10	11	1
	% по редове	61,5%	38,5%	91,7%	8,3%
	% по колони	15,4%	62,5%	10,7%	20,0%
35-50	Брой	88	6	92	4
	% по редове	93,6%	6,4%	95,8%	4,2%
	% по колони	84,6%	37,5%	89,3%	80,0%

От посочените в таблицата данни се вижда, че валидни са само връзките на съдовия инцидент с хомоцистеина (p = 0,01), с холестерола (p= 0,02) и с албумина (p<0,001), както и връзката на съдовия инцидент със захарния диабет (p=0,011). Останалите седем предполагаеми връзки за

конкретните условия на проучването се проявяват като статистически незначими ($p > 0,05$). Това обстоятелство също потвърждава ролята на хомоцистеина, заедно с холестерола и албумина при оценка риска от съдов инцидент.

Единичният корелационен анализ се използва за установяване и оценка на единичните корелации на хомоцистеина (1-ва и 6-та визита) с различни количествени променливи в рамките на цялата група от 120 пациенти и на създадените от нас групи. Значенията на коефициента на корелация (r) са в границите от 0 до ± 1 . Ако $r = 0$, връзка липсва. Коефициентът r се проверява за статистическа значимост. За нас са от значение връзки с $r > 0,4 - 0,5$.

На анализ подлагаме отношенията на хомоцистеина със следните показатели:

- Албумин – общо за извадката и за пациентите с $\text{Alb} < 35 \text{g/l}$;
- Креатинин – общо за извадката и за пациентите с Crea до 300, от 301 до 500, от 501 до 800, от 801 до 1 000, $\geq 1000 \mu\text{mol/L}$;
- hsCRP – за пациентите с $\text{hsCRP} \geq 3 \text{mg/l}$;
- Холестерол – общо за извадката и за пациентите с $\text{Chol} \geq 5,2 \text{mmol/l}$;
- Триглицериди – общо за извадката и за пациентите с $\text{Tg} \geq 2,3 \text{mmol/l}$;
- HDL холестерол – общо за извадката и за пациентите с $\text{HDL} \leq 1,7 \text{mmol/l}$;
- LDL холестерол – общо за извадката и за пациентите с $\text{LDL} \geq 3,36 \text{mmol/l}$;
- Калий – за пациентите с $\text{K} > 5,5 \text{mmol/l}$;
- Фосфат – за пациентите с $\text{P} > 1,45 \text{mmol/l}$;
- Урея – за пациентите с $\text{Urea} < 30$ и $\geq 30 \text{mmol/l}$;

Коефициентите на корелация (r) са представени в табл. 15.

Табл. 15. Коефициенти на корелация

Нсус:	Визита - 1			Визита – 6		
	r	p	n	r	p	n
hsCRP	-,226	0,013	120	-0,091	0,347	108
hsCRP (>=3)	-,254	0,012	96	-0,248	0,025	81
CreaP	0,310	0,001	120	0,028	0,776	108
CreaP (<=500)	0,309	0,355	11	-0,261	0,467	10
CreaP (501-800)	0,154	0,289	49	-0,036	0,819	42
CreaP (801-1000)	0,338	0,041	37	-0,143	0,421	34
CreaP (>1000)	0,187	0,394	23	-0,041	0,857	22
Chol	0,003	0,975	120	-0,155	0,109	108
Chol (>=5,2)	-0,103	0,603	28	-0,127	0,519	28
Tg	0,204	0,026	120	-0,033	0,732	108
Tg (>=2,3)	-0,318	0,062	35	-0,337	0,039	38
HDL	-0,042	0,647	120	0,051	0,602	108
HDL (<=1,7)	-0,055	0,559	117	0,014	0,890	105
LDL	0,015	0,870	120	-0,109	0,259	108
LDL (>=3,36)	0,238	0,393	15	0,020	0,929	23
Alb	0,186	0,042	120	0,023	0,814	108
Alb (<=35)	-0,079	0,702	26	0,159	0,622	12
P	0,135	0,140	120	-0,117	0,228	108
P (>1,45)	-0,024	0,830	80	-0,032	0,779	79
K	0,074	0,420	120	-0,065	0,507	108
K (>5,5)	0,069	0,552	76	0,043	0,670	101
Urea	0,084	0,360	120	-0,308	0,001	108
Urea (<=30)	0,056	0,574	103	-0,304	0,002	97
Urea (>30)	-0,238	0,357	17	-0,320	0,338	11

Като изхождаме от получените резултати, за статистически значими ($p < 0,05$) считаме връзките на хомоцистеина: с hsCRP ($r = - 0,23$) и $hsCRP \geq 3$ ($r = - 0,25$), с Crea ($r = 0,31$) и Crea от 801 – 1000 ($r = 0,34$), с Tg ($r = 0,20$), с Alb ($r = 0,19$) – при 1-вата визита; и с Urea ($r = - 0,31$) и $Urea \leq 30$ ($r = - 0,30$), с $Tg \geq 2,3$ ($r = - 0,34$) и с $hsCRP \geq 3$ ($r = - 0,25$). Връзките са статистически

значими, но са слаби по степен на проявление в конкретните условия на хемодиализа.

3. Моделиране на връзки на съдов инцидент чрез логистична регресия

Тази програма е разработена специално за нашето проучване и с нея се стремим да покажем по – точно връзките между хомоцистеина и другите лабораторни биомаркери, и съдовия инцидент.

Означаваме с Y съдов инцидент – алтернативната зависима променлива. Двете ѝ значения са 1 (пациентът е прекарал съдов инцидент) и 0 (пациентът не е прекарал съдов инцидент), а вероятностите за тяхното настъпване са съответно p и $(1 - p)$. Нека X е даден клинично-лабораторен показател – независима променлива, напр. хомоцистеин. Общият вид на логистичния модел в случая е

$$\ln (p / (1 - p)) = \beta_0 + \beta_1 X,$$

В компютърен вариант моделът приема вида: $P (E_x = 1) = 1 / (1 + e^{-Z})$, където $Z = \beta_0 + \beta_1 X$ ком. и където X ком е числен код на променливата X , зададен автоматично от компютърната програма.

Особеното в модела е, че вместо самата независима променлива Y в него участва вероятността за появяване на основното ѝ значение – 1 (пациентът се е разболял).

Отношението на шансовете (OR) се дефинира с равенството: $OR = e^{\beta}$. Именно то определя риска пациентите с дадено значение на променливата X да се разболеят ($Y = 1$).

Компютърната процедура по създаването на логистичния модел предоставя конкретни оценки за регресионните параметри β_0 и β_1 , отношението на шансовете (OR) и неговия доверителен интервал (95% ДИ).

Практиката показва, че ДИ се използва като главен критерий за адекватност на построенния модел – ДИ не трябва да съдържа 1.

Създадохме 2 вида модели за предполагаемите връзки на съдовия инцидент:

а) Единични с:

- хомоцистеин в диапазона: $< 50, \geq 50 \mu\text{mol/L}$
- албумин: $< 35; 35 - 50; > 50\text{g/l}$
- LDL холестерол: $< 3,36; \geq 3,36 \text{mmol/l}$
- Триглицериди: $< 2,3; \geq 2,3\text{mmol/l}$
- Холестерол: $< 5,2; \geq 5,2\text{mmol/l}$

б) Множествени с:

- Hcys ($<40; 40 - 50; >50$) и Tg ($<2,3; \geq 2,3$)
- Hcys($<40; 40 - 50; >50$) и Alb ($< 35; 35 - 50, > 50$)
- Hcys ($<40; 40 - 50; >50$), Chol ($< 5,2 ; \geq 5,2$), Tg ($< 2,3; \geq 2,3$), LDL ($< 3,36 ; \geq 3,36$), HDL ($\leq 1,7; > 1,7$) и Alb ($<35; 35-50, >50$).

Резултатите от компютърната процедура на логистичните регресии са изложени в табл. 16-18.

Табл. 16. Логистичен модел на връзката Ех – Hcys

	B	S.E.	Wald	df	p	OR	95% CI	
Hcys			7,284	2	0,026			
Hcys (40-50)	0,710	0,697	1,036	1	0,309	2,034	0,518	7,979
Hcys (>50)	2,367	0,899	6,932	1	0,008	10,667	1,831	62,133
Constant	-2,590	0,599	18,724	1	<0,001	0,075		

Табл. 17. Логистичен модел на връзката Ех – Alb

	B	S.E.	Wald	df	p	OR	95% CI	
Alb	-0,242	0,068	12,555	1	<0,001	0,785	0,687	0,898
Constant	6,976	2,441	8,166	1	0,004	1071,028		

Табл. 18. Логистичен модел на връзката E_x – Hcys, Alb

	B	S.E.	Wald	df	p	OR	95% CI	
Alb (<35; >=35)	-2,625	0,673	15,189	1,000	<0,001	0,072	0,019	0,271
Hcys			7,775	2,000	0,020			
Hcys (40-50)	1,452	0,794	3,339	1,000	0,068	4,270	0,900	20,264
Hcys (>50)	2,987	1,077	7,696	1,000	0,006	19,834	2,403	163,695
Constant	-1,439	0,645	4,978	1,000	0,026	0,237		

Изработихме единичният логистичен модел на връзката „съдов инцидент – хомоцистеин“ и той е:

$$P(E_x = 1) = 1 / (1 + e^{(-2,590 + 2,367 * X_{ком})})$$

Той е със статистически значими регресионни параметри: Const = -2,590, W = 18,724, p < 0,01; и B за Hcys (>50mmol/l) = 2,367, W = 6,932, p = 0,008.

Отношението на шансовете OR за Hcys (> 50µmol/L) е OR = 10,667 с 95%CI = 1,831 - 62,133, който не съдържа числото 1. Това означава, че пациентите със стойности на хомоцистеина по-високи от 50 µmol/L са 11 пъти по-голям риск да развият съдов инцидент от пациентите с Hcys < 40 µmol/L.

Регресионният коефициент за Hcys (40 µmol/L – 50 µmol/L) е в = 0,710 и е статистически незначим (p = 0,309 > 0,05). По тази причина нямаме достатъчна убеденост да тълкуваме съответстващото му шансово отношение OR = 2,034. В подкрепа на това заключение е и 95% CI = 0,518 – 7,979, който съдържа числото 1. Ако приемем тези данни като една насочваща информация за потенциален риск на пациентите с Hcys (40 – 50µmol/L), то той е ~ 2 пъти по-висок от риска на пациентите с Hcys (< 40 µmol/L).

Единичният логистичен модел на връзката на съдов инцидент с Alb като количествена променлива е представена на табл. 18. От нея се вижда, че моделът е статистически значим (p < 0,01; 95% CI < 1). За Alb шансовото

отношение е $OR = 0,785$, т.е. ако пациентите увеличат с $1g/l$ стойността на серумния Alb, рискът да развият съдов инцидент намалява с $21,5\%$ ($100\% - 78,5$).

Стъпковата регресия се явява окончателен и най-прецизен сценарий за провеждане на логистичен анализ. Установяват се два показателя със съществено значение за развитие на съдов инцидент сред пациентите на хемодиализа – хомоцистеин и албумин. За пациенти с $Hscys > 50 \mu mol/L$ спрямо пациенти с $Hscys < 40 \mu mol/L$ шансовото отношение $OR = 19,834$ с $95\% CI = 2,403 - 163,695$, т.е. $Hscys$ е рисков фактор: с увеличаване на стойностите му рискът от съдов инцидент расте. За пациентите с $Alb \geq 35 g/l$ в сравнение с пациенти с $Alb < 35 g/l$ шансовото отношение $OR = 0,072$ с $95\% CI = 0,019 - 0,271$, т.е. албуминът има протективен ефект: с увеличаване на стойностите му рискът от съдов инцидент намалява.

Линейните модели достатъчно точно описват временните редове. Коефициентите на вариация са много по-малки от критичната стойност $V_{кр} = 0,15$ (табл. 19).

Табл. 19. Коефициенти на вариация на временните редове

Група	P	Tg	Chol	HDL	LDL	Urea	Alb	CRPhs	CreaP
	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Общо	0,026	0,067	0,010	0,032	0,022	0,035	0,010	0,056	0,020
Мъже	0,021	0,075	0,012	0,045	0,025	0,033	0,009	0,119	0,020
Жени	0,051	0,072	0,018	0,021	0,023	0,051	0,014	0,082	0,035
<=55 г.	0,029	0,068	0,015	0,037	0,025	0,034	0,015	0,048	0,026
56 г.+	0,029	0,063	0,012	0,029	0,029	0,043	0,005	0,082	0,019
ЗД	0,045	0,065	0,025	0,059	0,031	0,057	0,009	0,142	0,025
АХ	0,024	0,066	0,022	0,061	0,024	0,038	0,014	0,133	0,023
Ех	0,088	0,263	0,072	0,070	0,091	0,116	0,016	0,189	0,067
Без Ех	0,029	0,050	0,010	0,028	0,022	0,037	0,009	0,074	0,021

Трендовите стойности на показателите са израз на ефекта на причини с постоянно действие върху пациентите на хемодиализа. Този ефект средно за визита през наблюдавания период се измерва със стойността на коефициента V_1 .

За да подредим показателите по степента на тяхната промяна от 1-ва до 6-та визита, стандартизираме коефициентите V_1 със съответните средни стойности, т.е.

$$i = V_1 / \bar{X}_{Cp} .$$

Резултатите (индексите i) от тази процедура по отношение на цялата извадка от 120 пациенти са показани на табл. 20 в намаляващ ред по i .

20. Индекси на промяната на показателите, средно за визита

№	Показатели	V_1	X_{Cp}	i
1	hsCRP	0,475	8,88	0,053
2	Триглицериди	0,063	2,05	0,031
3	LDL холестерол	0,063	2,41	0,029
4	HDL холестерол	0,021	0,99	0,021
5	Албумин	0,365	38,02	0,010
6	Неорганичен фосфат	0,010	1,80	0,006
7	Холестерол	0,021	4,42	0,005
8	Креатин	3,875	797,72	0,005
9	Урея	0,035	23,24	0,002

От таблицата се вижда, че: всички средни стойности по визити на hsCRP са по-високи от 3mg/l; средните стойности на Tg за 3-та, 4-та, 5-та и 6-та визита са по-високи от горната референтна граница - 2,3 mmol/l; всички средни стойности по визити на HDL са по-ниски от 1,7 mmol/l; всички средни

стойности по визити на албумина са в границите на референтния интервал – 35 – 50 g/l, но са в областта до долна референтна граница; всички средни стойности по визити на неорганичния фосфат са по-големи от 1,45 mmol/l; всички средни стойности по визити на холестерола са по-малки от 5,2; всички средни стойности по визити на креатинина са много по-високи от 104 μ mol/L; всички средни стойности по визити на уреята са много по-високи от 8,3 mmol/l.

От казаното следва, че с най-чувствителни динамични изменения и то извън границите на референтните стойности, са hsCRP, триглицеридите и HDL холестерола. Разглеждайки динамичните промени на тези показатели по диагнози можем да потвърдим първостепенната роля на тези три показателя в диагностиката и предсказване на риска от съдови заболявания при пациентите на. В нашето проучване потвърдихме особено голямата роля на hsCRP при определяне на риска от съдов инцидент в групата пациенти със ЗД на хемодиализа ($v_1 = 1,852$; при общо за извадката $v_1 = 0,475$). Вижда се, че връзката hsCRP/ пациенти със ЗД на хемодиализа е статистически значима, т.е. при тези пациенти със високи стойности на hsCRP, риска от съдов инцидент е по-голям.

Получените от това проучване резултати показват, че хомоцистеина е ценен, полезен, неинвазивен показател, който следва да намери и в нашата страна място при оценка на риска от съдов инцидент при пациентите на хронична хемодиализа.

В заключение смятаме, че е нужно и в нашата страна да се въведе и използва биомаркера хомоцистеин, в лабораторната профилактика на пациентите на диализно лечение за оценка на риска от съдов инцидент. Успоредно с хомоцистеина трябва да се вземат предвид и други важни лабораторни биомаркери като hs CRP, Tg, HDL, LDL, Chol, Alb и др. Както се видя от нашето проучване комплексната оценка с тези показатели ни дава точна и надеждна информация при преценката на риска от съдов инцидент при пациентите на хемодиализа. Не на последно място трябва да се оцени и протективната роля на Alb в контекста на риска от съдов инцидент при тези пациенти. Ранен скрининг за хиперхомоцистеинемия е препоръчителен при пациентите от високо- рискови групи в т.ч. пациенти на диализно лечение, диабетици, пациенти с АХ и др. Трябва да се изтъкне икономическата ефективност и предимствата на скрининга за хиперхомоцистеинемия, пред последващите усложнения като съдови заболявания (инфаркт или инсулт) и преждевременна смъртност.

V Изводи

1. Въведен и верифициран е метод за определяне на тотален хомоцистеин в серум.
2. Установихме висок коефициент на корелация между ензимния и кинетичния метод на Jaffe за определяне на креатинин.
3. Оценихме диагностичните качества на хомоцистеина – чувствителност, специфичност, положителна и отрицателна предиктивна стойност.
4. Доказахме предиктивната роля на хомоцистеина по отношение риска от съдов инцидент. Всички пациенти, които в рамките на периода на проучването са претърпели съдов инцидент (инфаркт или инсулт), още в началото са показали сигнификантно по – високи нива на хомоцистеин, в сравнение с останалите пациенти.
5. На фона на динамиката на смъртните случаи вследствие съдов инцидент доказахме, че потенциалния риск от съдов инцидент при пациентите с Hcys в границите от 40 до 50 μ mol/ е 2 пъти по-висок от риска при пациентите с Hcys < 40 μ mol/L, докато при пациенти със стойности на хомоцистеина по-големи от 50 μ mol/L този риск е 11 пъти по - голям.
6. Класифицирахме изследваните от нас биохимични показатели в две групи: първа, с голямо разнообразие и тежест на ефектите по отношение на съдов инцидент – хомоцистеин и албумин, и втора, с умерено разнообразие и тежест – холестерол, триглицериди, LDL, hs CPR. При тях повишението в края на проучването спрямо началото е статистически значимо, като най – голямо е повишението на HCYS – 40%.

7. Установихме, че риска от съдов инцидент при пациенти на хемодиализа(особено и диабетици) се повишава, когато имаме едновременно увеличение на хомоцистеин и hsCRP, особено при стойности на hsCRP $\geq 3\text{mg/l}$.
8. Установихме връзката на хомоцистеина с креатинина, особено в областта 801 – 1000 $\mu\text{mol/L}$. Пациентите с високи стойности на креатинин, които са и с повишен серумен хомоцистеин са по-застрашени от съдов инцидент (инфаркт или инсулт).
9. Доказахме, че албуминът се явява фактор с протективен ефект – с увеличаване на стойностите му рискът от съдов инцидент намалява. За пациентите с Hcys $> 50\mu\text{mol/L}$ и Alb $< 35\text{g/l}$ рискът от съдов инцидент е 1,44 пъти по- висок и в тази ситуация на съвместно двуфакторно влияние, рискът за такъв пациент да претърпи съдов инцидент е 60%.

VI Приноси

1. За първи път в България е въведен и верифициран метод за определяне на тотален хомоцистеин в серум на нов принцип на тестване с ензимна цикличност, който оценява продукта от превръщането на ко субстрат, вместо да оценява ко субстрата или продуктите от превръщането на Hcy.
2. За първи път у нас е използвана адекватна система от статистически методи за комплексен анализ и моделиране на връзки на биохимични показатели с оглед на тяхната диагностична и прогностична стойност при определяне на риска от развитие на съдови инциденти при пациенти на хемодиализа.
3. За първи път в българска група пациенти на хемодиализа е документирана прогностичната роля на тоталния хомоцистеин по отношение риска от развитие на съдов инцидент.
4. За първи път, въз основа на изследването на 11 биохимични показателя се прави класификация на лабораторните биомаркери по отношение на риска от съдов инцидент при пациентите на диализно лечение: първа група – с голямо разнообразие и тежест на ефектите – хомоцистеин и албумин, и втора група, с умерено разнообразие и тежест – холестерол, триглицериди, LDL, hsCRP.
5. За първи път у нас се доказва предиктивния ефект на хомоцистеина по отношение на риска от съдов инцидент, сред пациентите на хемодиализа. Доказахме, че в ситуация на двуфакторно(рисково и протективно) влияние, вероятността един пациент с Hcy $>$ 50 μ mol/L и Alb $<$ 35g/l да претърпи съдов инцидент е 60%.

6. Нашите резултати могат да послужат като информационна база за оптимизиране на диагностичния процес при пациенти на хемодиализа, с оглед превенция на риска от съдови заболявания (инфаркт или инсулт) и преждевременна смъртност.

VII Списък на научните трудове, свързани с дисертационния труд

В български издания

1. **Gencheva I.**, Ruseva A. Effects of glucose and bilirubin on the kinetic Jaffe, s and the enzymatic methods for serum creatinine assay, Journal of Biomedical & Clinical Research, 2015, Vol 8, Number 1, 35-39
2. **И. Генчева**, А. Русева, П. Лалева и Ю. Пастухов. Хомоцистеин и високочувствителен С-реактивен протеин при пациенти на хемодиализа като маркери за кардиоваскуларен риск - Медицински преглед, 52, 2016, № 1, 42-46

В чужди списания

1. **Gencheva I.** and Ruseva A. Diagnostic value of homocysteine and albumin in dialysis patients Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences (ISSN: 2354-323X) Vol. 4(2) pp. 098-101, February, 2016
2. **Irena Ivanova Gencheva-Angelova** , Adelaida Lazarova Ruseva and Pavlina Dimitrova Yordanova-Laleva, The Role of Homocysteine and Other Clinical Laboratory Markers in Assessing Cardiovascular Risk in Patients on Hemodialysis Journal of Life Sciences 10 (2016) 48-53

Участия в научни форуми в България

1. **Dr. Irena I. Gencheva**, Dr. Adelaida L. Ruseva, Effects of glucose and bilirubin on the kinetic Jaffe's and the enzymatic methods for serum creatinine assay, Clinical laboratory conference, Borovez, 2015