

РЕЦЕНЗИЯ

от

доц. д-р Даниела Иванова Герова, дм

Катедра по Клинична лаборатория

Факултет по Медицина, МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ Варна
вътрешен член на научно жури за присъждане на ОНС „ДОКТОР“

Относно: Защита на дисертационен труд и процедура
за придобиване на образователна и научна степен (ОНС) „ДОКТОР“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Докторска програма: „Клинична лаборатория“

докторант: д-р Севим Ахмед Шефкет

Катедрата по Клинична лаборатория,

Факултет по Медицина, МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ Варна

Форма на докторантурата: редовна форма на обучение

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

Научен ръководител: доц. д-р Яна Димитрова Бочева, дм

Катедрата по Клинична лаборатория,

Факултет по Медицина, МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ Варна

Общо представяне на процедурата

Със заповед № 109-112/11.03.2022 г. на проф. д-р Валентин Игнатов, дм, Ректор на Медицински университет – Варна, на базата на решение на Факултетния съвет на Факултета по Медицина по Протокол №61/01.03.2022 г. съм избрана за вътрешен член на Научното жури за защита на дисертационния труд на д-р Севим Ахмед Шефкет. На основание Протокол №1/23.03.2022 г. съм определена да бъда председател на Научното жури и да изготвя **рецензия** по процедурата за придобиване на образователна и научна степен „доктор“.

Представените материали по процедурата са в съответствие с изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България, както и с Правилника за развитието на академичния състав на МУ-Варна за присъждане на образователна и научна степен „доктор“.

Кратка биография и данни за кариерното развитие и квалификация на докторанта

Д-р Севим Ахмед Шефкет завършва средното си образование в родния си град Шумен през 2004 г., а висшето си медицинско образование през 2010 г. в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна, България (диплома №000646/2010). Веднага след дипломирането си започва работа като лекар към ЦСМП – Варна, а малко след това като лекар в МЦ „Юг“. През 2014г. започва специализация по клинична лаборатория в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна. От 2016 г. е назначена като лекар-специализант по Клинична лаборатория към Клинична лаборатория на УМБАЛ „Света Марина“ Варна, където успешно приключва със специализацията си и през 2019 г. придобива Свидетелство за призната специалност по Клинична лаборатория (№4077/2019). От 2019 г. е назначена и като асистент по клинична лаборатория към Катедра Клинична лаборатория, Факултет по Медицина, МУ-Варна. Основните ѝ отговорности като преподавател са свързани с обучението на студенти по специалност „Медицина“ (БЕО) и „Медицинска сестра“. По същото това време се зачислява и като редовен докторант по Докторска програма: „Клинична лаборатория“. За периода 2019 г. – 2022 г. полага упорит труд и успява да представи докторския си труд в рамките на определените за това срокове.

За краткия период на работа в УМБАЛ „Света Марина“ д-р Шефкет развива активна научна дейност като участва в 7 научни форуми в страната и чужбина. Научните ѝ интереси са в областта на лабораторната диагностиката на хроничното бъбречно заболяване и диабетното бъбречно заболяване. Част от тези интереси са представени в 4 статии, публикувани в български и международни списания.

Д-р Севим Ахмед Шефкет е член на БЛС и на Българското дружество по Клинична лаборатория.

Актуалност на разработваната тема

Дисертационният труд на д-р Севим Ахмет Шефкет е посветен на актуален проблем на ендокринологията, а именно ранно установяване на диабетното бъбречно заболяване (ДБЗ). Захарният диабет (ЗД) е заболяване с изключително голяма социална значимост. Непрекъснатото нарастване на честотата му с риск да достигне епидемични размери изисква всеобхватни мерки както относно превенцията му, така и относно добрия му контрол и управление на риска от възникване на тежки усложнения. Едно от най-тежките усложнения е ДБЗ, често водещо до терминална бъбречна недостатъчност.

Най-новите литературни данни водят до промяна в традиционното схващане, че при захарния диабет първично се уврежда гломерулът и вторично тубулната система на нефрона. Все повече се налага мнението за първичната роля на тубулната увреда при ДБЗ. Съвсем логично е да се търсят нови, по-показателни от класическите гломерулни показатели, чиито нива се променят достатъчно рано при тубулното засягане на нефрона и имат възможността да отразяват коректно дори субклиничната бъбречна дисфункция. Един от най-обещаващите тубулни биомаркери е неутрофилният гелатиназо-асоцииран липокалин (NGAL) и темата на настоящия труд „Предиктивна роля на NGAL като ранен маркер за бъбречно увреждане при пациенти със ЗД тип I и ЗД тип II“ е безспорно актуална и много перспективна.

Обща характеристика и структура на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд е с обем и във вид, отговарящ на изискванията на Закона за развитие на академичния състав и Правилника за развитие на академичния състав на МУ-Варна. Отпечатан е на 150 стандартни страници и е онагледен с 47 таблици и 36 фигури. Дисертацията е структурирана правилно и включва: заглавна страница, съдържание – 2 стр., съкращения – 1 стр., въведение – 1 стр., литературен обзор – 40 стр., цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 7 стр., резултати – 37 стр., дискусия на резултатите – 33 стр., изводи – 2 стр., приноси – 2 стр., списък на публикациите и участията в научни форуми, свързани с дисертационния труд – 1 стр., два броя приложения – 4 стр. и библиографска справка – 18 стр., включваща общо 221 литературни източника: 211 на латиница и 10 – на кирилица. Осем от цитираните източници (3,6%) са публикувани през последната 2021 година, а 152 източника (68,8%) – в периода 2011-2020, 47 източника (21,3%) са публикувани през периода 2001-2010 година и само 13 източника (5,9%) – в периода преди 2000 година. Така от всички цитирани в дисертационния труд литературни източници, 160 са издадени в последните единадесет години и представляват 72,4% от цялата литературна справка, което от своя страна е добра предпоставка за съвременна трактовка на проблематиката, представена в дисертационния труд.

Оценка на структурните части на дисертационния труд

Литературният обзор е представен в няколко раздела. Първоначално е направен общ преглед на захарния диабет, като са включени актуални данни относно неговото разпространение и класификация. Внимание е отделено на критериите за диагностика и класификация на хроничното бъбречно заболяване и в частност на ДБЗ. Разгледани са

рисковите фактори за развитие на ДБЗ, както и патоморфологичните промени в тубулоинтерстициума при диабетна нефропатия (ДН). Докторантът умело борави с литературата и успява да докаже, че функционални и структурни промени в тубулите и кортикалния интерстициум могат да предшестват патогномичните изменения в гломерула, с което се достига до *промяна в традиционната парадигма за патогенезата на ДБЗ – от гломерулоцентрична към тубулоцентрична хипотеза*. От съществено значение в този раздел на обзора е, че се доказва ролята на тубулното увреждане за развитието и прогресията на протеинурията при ЗД. В края на този раздел съвсем логично се разглеждат рутинните лабораторни параметри, които понастоящем се използват за диагностиката и класификацията на ХБЗ и ДБЗ. Подчертани са недостатъците и ограниченията на GFR и ACR/AER, както и на широко използваните сурогатни маркери (формули за изчисляване на eGFR). Това обуславя търсенето и въвеждането в клиничната практика на нови маркери в диагностиката на ДБЗ.

В следващите раздели докторантът събира и обобщава всички достъпни данни относно структурата, метаболизма и молекулните механизми на биологично действие на NGAL, обект на нейните научни търсения. Представена е ролята му за диагностиката на ХБЗ и ДБЗ. Експоненциално са нараснали данните за NGAL като *маркер за тубулоинтерстициално увреждане*, който може да установи развитието на ДБЗ, далеч преди неговото доказване посредством AER. Освен като *ранен маркер* при диагностиката на ДБЗ, плазмените и уринни стойности на NGAL са полезни показатели за *стадирането и оценка на риска* от развитие на съдови усложнения при прогресията на ДБЗ. Посочени са и данни за уринния NGAL (uNGAL) като *неинвазивен маркер* с потенциал да разграничи ДБЗ от недиабетното бъбречно заболяване (НДБЗ), както и да послужи като основание за извършване на потвърждаваща бъбречна биопсия, за която все още няма изработени стандартизирани критерии при пациенти със ЗД. Представени са и данни, които опровергават горепосочените наблюдения. Лансира се идеята, че метаболитните промени при ЗД водят до хронично проинфламаторно състояние, което от своя страна обуславя повишеното производство на NGAL от екстраренални тъкани. Особено внимание заслужава и фактът, че при инфекциите на пикочните пътища (ИПП), често срещано явление при ЗД, се установяват повишени стойности на uNGAL, като острофазов белтък.

Липсата на стандартизация на различните имунохимичните методи, с които се изследват плазмените нива на NGAL (pNGAL) и uNGAL, води до различия както в

референтните им граници, така и на диагностичните им cut-off стойности, силно зависими от използвания метод, платформа за изследване и вид на биологичния материал. Това затруднява сравнителния анализ на резултатите, получени при различни проучвания. Част от противоречивите резултати в литературата се дължат и на недостатъчната информация за източниците на аналитична интерференция, оптималния биологичен материал за анализ и биологичната вариация, влияеща се съществено от подбора и разпределението на индивидите в изследваните групи.

Критичният анализ и обобщение на представените в литературния обзор научни данни позволяват на д-р Шефкет да формулира точно *целта* на дисертационния си труд, а именно *да се определи диагностичната надеждност на NGAL като маркер за ДБЗ при пациенти със ЗД тип I и ЗД тип II*. За успешното постигане на тази цел са формулирани *седем конкретни задачи*, които следват логически една след друга.

Разделът „*Материали и методи*“ е представен на 7 страници. Проучването е проспективно по вид и е започнало след получаване на одобрение от Комисията по етика на научните изследвания към МУ – Варна. Обхваща тригодишен период, в който първоначално са включени общо 312 индивида за изследване. Осемнадесет индивида отговарят на критериите за изключване. След отпадането им, в проучването остават *294 лица*, напълно покриващи критериите за включване и разпределени както следва: *127 здрави индивида* – 85 възрастни индивида над 18 годишна възраст и 42 деца под 18 годишна възраст и *167 болни от ЗД* – 92-ма възрастни пациенти със ЗД тип II и 75 деца със ЗД тип I.

От всички участници са взети *три типа* биологичен материал:

- пълна K₂EDTA кръв за изследване на кръвна картина и HbA1c
- хепаринизирана плазма за изследване на pNGAL, урея, креатинин, общ холестерол, HDL-холестерол, LDL-холестерол и триглицериди
- първа сутрешна урина, която е изследвана полуколичествено с уринни тест ленти; след центрофугиране е оценен седимента, а от отделения супернатант са определени количествено uNGAL, креатинин и албумин

Всички проби са изследвани до два часа след получаване на биологичния материал за всички изброени параметри посредством рутинни съвременни лабораторни методи, освен за NGAL. Пробите за NGAL (плазма и урина) са съхранени в етикетирани вакутейнери без адитив при -20°C до извършване на анализа, за период не по-дълъг от 3 месеца. Анализът на pNGAL и uNGAL е извършен серийно на

биохимичен анализатор ADVIA 1800 с помощта на латекс усилен имунотурбидиметричен метод на фирмата BioPorto Diagnostics A/S, Дания, разрешен за IVD употреба в Европейския съюз.

За анализ и обработка на получените резултати са приложени адекватни статистически методи.

Материалите и методите са подходящо подбрани и са в съответствие с дефинираната цел и поставените за изпълнение основни задачи.

Разделът „*Резултати*“ е изложен на 37 страници, в които научните резултати са описани коректно, онагледени със съответни таблици и графики и са представени в последователност, съответстваща на поставените задачи:

1. *Верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL.*

Извършена е проверка на калибрационната крива и проверка на аналитичния измервателен диапазон. Установена е по-ниска стойност на Lower Limit of Quantification (LLOQ) от тази, обявена от производителя на кита. Изследвана е съвкупността от характеристики, описващи аналитичната надеждност на количествени методи, *като стриктно са спазени* както насоките на ISO 17025 – Requirements for Method Verification, така и критериите за приемливост на аналитичните характеристики, съобразени с EMEA/CHMP/EWP/2009 Guideline on bioanalytical method validation. Установена е висока аналитична надеждност на метода.

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

За тази цел е изследван NGAL в плазма и урина от 85 здрави възрастни индивида (45 жени и 41 мъже) на средна възраст 52.96 ± 8.39 години. Поради не Гаусово разпределение на резултатите, се налага тяхното нормализиране, след което е приложен персентилен метод за установяване на референтните граници (2.5 и 97.5 персентил, при 95% доверителен интервал). След стриктно спазване на всички правила за определяне на общи, полово независими референтни граници, те са както следва: pNGAL: 25-119.49 ng/mL; uNGAL <52.37 ng/mL; съотношение uNGAL към креатинин в урината, обозначено като UNC: <5.16 $\mu\text{g}/\text{mmol}$.

По отношение на биологичната вариация на тези параметри се изследва:

a) *влиянието на пола* – установено е статистически значимо полово различие само за UNC, което се подкрепя и от потвърдената значимата разлика по пол в нивата на креатинин в урината. Това налага да се изведат и полово зависими референтни граници за UNC, а именно: <6.34 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ за жени и <3.36 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ за мъже.

б) *влиянието на възрастта* – общата група е подразделена в три възрастови подгрупи: ≤ 49 г. между 50 и 59 г. и ≥ 60 г. Установено е, че диференцирането по възраст на контролната кохорта довежда до намаляване броя на лицата в отделните подгрупи, което ограничава възможността за извеждане на статистически значимо различни възрастово зависими РГ и за трите параметъра. След обединение на първа и втора подгрупи, е доказано статистически значимо различие за параметъра pNGAL за новосформираните две възрастови групи: < 60 г. и ≥ 60 г. Изследвани са и установени статистически значими корелационни зависимости: *възраст/eGFR* (отрицателна) и *възраст/pNGAL* (положителна). С това се обяснява статистически значимата отрицателна корелационна връзка между pNGAL и eGFR.

3. *Референтни граници на NGAL при деца. Биологична вариация*

За тази цел е изследван NGAL в плазма и урина от 42 здрави деца (21 момичета и 21 момчета) на средна възраст 12.50 ± 3.69 г. Поради не Гаусово разпределение на резултатите, се налага тяхното нормализиране, след което е приложен персентилен метод за установяване на РГ (2.5 и 97.5 персентил, при 95% доверителен интервал). След стриктно спазване на всички правила за определяне на общи, полово независими РГ, те са както следва: за pNGAL < 96.88 ng/mL; за uNGAL < 47.30 ng/mL и за UNC < 3.48 $\mu\text{g}/\text{mmol}$. Не са установени сигнификантни различия между двата пола, както и липсва сигнификантна корелация между трите изследвани параметъра с възрастта.

4. *Диагностична надеждност на NGAL при диагностиката на ДБЗ при ЗД тип II*

За изпълнението на тази задача докторантът е изследвал 92-ма пациента (51 жени и 41 мъже) с потвърдена спрямо критериите на ADA и WHO диагноза ЗД II. Разпределени са в *три подгрупи спрямо ACR*: A1 при ACR < 3 g/mol, A2 при ACR 3–30 g/mol и A3 при ACR > 30 g/mol и в *две подгрупи спрямо eGFR*, изчислена по формулата CKD-EPI: $\leq G2$ при $eGFR_{62} \geq 60$ mL/min/1.73m² и $\geq G3$ при $eGFR < 60$ mL/min/1.73m² (уточнено е, че разпределението в четири групи от G1 до G4 намалява броя на пациентите в подгрупите и ограничава възможността за статистическа обработка на данните, а G5 е изключващ критерий за проучването). Освен това пациентите са разпределени в други две подгрупи, в зависимост от това дали имат или нямат ДБЗ, определено според насоките на KDIGO 2020.

Избрани са коректни непараметрични методи за статистически анализ.

По отношение на pNGAL са установени статистически значими различия между контролната група и подгрупи A3 и $\geq G3$, както и за подгрупата с ДБЗ. Проведеният

ROC анализ при cut-off стойност от 121.65 ng/mL за pNGAL установява добра диагностична ефективност (82%) с AUC = 0.753 за отдиференциране на пациентите със ЗД II с понижена eGFR от тези със запазена eGFR, но е установена лоша към достатъчна диагностична ефективност по отношение на разграничаване на пациентите с албуминурия и нормалбуминурия.

По отношение на uNGAL и UNC е установено, че стойностите корелират сигнификантно с промените в албуминовата екскреция, като UNC показва по-добра зависимост с ACR от uNGAL. Стойностите на uNGAL и UNC нарастват прогресивно от A1 до A3, като сигнификантна разлика се констатира между A1 vs A2 и между A1 vs A3. Пациентите със ЗД II с умерено и силно повишена ACR имат статистически значимо по-високи резултати за uNGAL и UNC от контролната група, като пациентите с нормоалбуминурия (A1) имат и сигнификантно по-високи резултати за UNC. Установена е и полова разлика в стойностите на UNC в подгрупите пациенти, разделени спрямо ACR и eGFR. Жените имат по-високи резултати за UNC от мъжете във всяка една от подгрупите, като разликата е сигнификантно значима само в подгрупа A1 и в подгрупата с $eGFR \geq 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ и намалява с прогресията на бъбречното увреждане.

Проведени са множество ROC анализи и са определени диагностични cut-off стойности за pNGAL, uNGAL без да са диференцирани по пол. За pNGAL е установена cut-off стойност за отдиференциране на болни с намалена гломерулна филтрация, а за uNGAL са установени cut-off стойности за отдиференциране както на болни с ДБЗ, така и с албуминурия. За UNC са изведени и полово-зависими cut-off стойности, за да се отдиференцират както болни с ДБЗ, така и с албуминурия. Обобщава се, че UNC показва по-добра диагностична ефективност от uNGAL в разграничаване на пациентите със ЗД II с бъбречно увреждане, което дава основание да бъде предпочетен при оценка ролята на комбинираното приложение на два маркера – pNGAL и UNC. Установено е, че повишението на UNC с $1 \mu\text{g}/\text{mmol}$ увеличава шанса 1.29 пъти пациент със ЗД II да има ДБЗ. И след разделяне на пациентите по пол, UNC продължава значимо да прогнозира наличието на ДБЗ, като при жени увеличението на UNC с $1 \mu\text{g}/\text{mmol}$ повишава вероятността за ДБЗ 1.16 пъти, а при мъже – 2.40 пъти.

5. *NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД тип II*

Докторантът е подразделил пациентската кохорта на 4 групи според тежестта и прогнозата на ДБЗ, определени спрямо стойностите на ACR и eGFR и съгласно

насоките на KDIGO 2020 (съответно пациенти с нисък, умерен, висок и много висок риск). Тъй като лошият гликемичен контрол е основен фактор в развитието и прогресията на ДБЗ, общата група пациенти е подразделена още на други две групи в зависимост от гликемичния им контрол (с добър контрол – HbA1c \leq 7.5 % и с лош контрол > HbA1c >7.5 %).

Установено е, че стойностите и на трите изследвани показателя, pNGAL, uNGAL и UNC, нарастват прогресивно със степента на бъбречното увреждане. Сигнификантна значимост е достигната само при изследваните уринните показатели (стойностите на uNGAL и UNC в групата с нисък риск се различават статистически значимо от тези във всички останали групи – умерен, висок и много висок риск). По отношение на двете групи с добър и лош гликемичен контрол не е установена сигнификантна разлика в стойностите на pNGAL, uNGAL и UNC. При изследване на корелационните зависимости е установена значима позитивна корелация между pNGAL и урея и креатинин, а отрицателна за eGFR (маркери за оценка на гломерулната филтрация), докато за уринните показатели значими позитивни корелации са установени с AER, ACR и отрицателна с eGFR, за UNC допълнително е установена слаба позитивна, но значима корелационна връзка с HbA1c. С помощта на дискриминантен анализ са изследвани два маркера едновременно и е оценена прогностичната им стойност. Установено е, че моделът, използващ pNGAL и UNC едновременно, е способен статистически значимо да дискриминира групите с ДБЗ и изведената дискриминантна функция ($D = -1.43 + \text{UNC} \times 0.068 + \text{pNGAL} \times 0.08$) успешно прогнозира разпределението на 57% от пациентите със ЗД II в съответните групи. За сравнение самостоятелно използваните показатели pNGAL, uNGAL или UNC прогнозира успешно разпределението на 26%, 42.4% и 49% от пациентите със ЗД тип II в съответните групи. За да се оцени вероятността, с която pNGAL и UNC заедно могат успешно да прогнозира наличието на ДБЗ с висок и много висок риск сред пациентите със ЗД тип II, е проведен логистичен регресионен анализ, след като пациентите са преразпределени в две основни групи (една група – пациенти с нисък и умерен риск и друга – пациенти с висок и много висок риск). Моделът коректно класифицира 75% от пациентите със ЗД II към така дефинираните групи. Установено е, че повишението на pNGAL с 1ng/mL увеличава шанса 1.01 пъти пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск, а повишението на UNC с 1 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ увеличава вероятността пациент със ЗД II да има ДБЗ с висок и много висок риск 1.09 пъти (жени – 1.07 пъти, мъже –

1.14 пъти). За сравнение – самостоятелното използване на uNGAL и UNC успява коректно да класифицира пациентите в двете групи съответно в 66% и 65%.

б. *NGAL* маркер за диагноза и прогноза на ДБЗ при пациенти със ЗД тип I

Докторантът е подбрал за участие в проучването 75 пациента (33 момичета и 42 момчета) на средна възраст 13.38 ± 2.82 г. Лицата са с доказан ЗД I с продължителност на заболяването от 5 до 14 г. (7.09 ± 2.59 г.). Обосновано е разделянето им само в две подгрупи спрямо ACR (A1 – при ACR < 3 g/mol, A2 при ACR 3 – 30 g/mol) и на две подгрупи спрямо eGFR: веднъж според формулата eGFR(Bedside Schwartz) и още веднъж според eGFR(CKD-EPI40), с гранична стойност на eGFR=90 mL/min/1.73m². В зависимост от гликемичния контрол децата са разделени в две подгрупи, като разграничаваща стойност за HbA1c е 7.5%. Избрано е да не се формират групи ЗД тип I с и без ДБЗ, тъй като те са идентични с A1 и A2, поради факта, че само при един пациент е установена eGFR < 60 mL/min/1.73m² и патологична албуминурия. Cut-off стойностите, изведени в настоящото проучване за идентифициране на патологична албуминурия при пациенти със ЗД I, съответстват на cut-off стойности за ДБЗ. Извършеният регресионният анализ разкрива много добра зависимост между двете използвани формули за изчисление на eGFR и липса на статистически значима разлика при сравнение на резултатите. Изследвани са pNGAL, uNGAL и UNC

При сравнение на цялата пациентска кохорта със ЗД I с контролната група деца единствено резултатите за UNC са сигнификантно по-високи.

По отношение на pNGAL в различните видове на подразделение на пациентите е установена статистически значима разлика при групите, подразделени спрямо eGFR_(CKD-EPI40). Децата със стойност ≥ 90 mL/min/1.73m² са с медиана за pNGAL значимо по-ниска от тази в групата с eGFR(CKD-EPI40) < 90 mL/min/1.73m² (53.95 (41.63 – 67.30) ng/mL vs 77.10 (53.90 – 111.60) ng/mL). Проведеният корелационен анализ между pNGAL и всички останали показатели показва статистически значима отрицателна корелация единствено между pNGAL и eGFR_(CKD-EPI40), като се наблюдава подобна тенденция и за взаимовръзката pNGAL/eGFR(Bedside Schwartz). Проведеният ROC анализ показва диагностична ефективност от 72% в разграничаването на пациентите със ЗД I с леко понижена гломерулна филтрация при cut-off стойност на pNGAL = 96.80 ng/mL.

По отношение на uNGAL е установена сигнификантна разлика за всички сравнения между групите, подразделени въз основа на албуминурията с изключение

между A1 и контролната група. Корелационният анализ показва статистически значима положителна корелация между двойките uNGAL/AER, uNGAL/ACR, uNGAL/HbA1c, uNGAL/BMI и uNGAL/TG. Проведеният ROC анализ показва диагностична ефективност от 86% за правилно идентифициране на пациентите със ЗД I с албуминурия при cut-off за uNGAL = 47.85 ng/mL.

По отношение на UNC е установена сигнификантна разлика за всички сравнения между групите, подразделени въз основа на албуминурията с изключение между A1 и контролната група, както и за групите подразделени въз основа на гликемичния контрол. Корелационният анализ показва статистически значима положителна корелация между двойките UNC/AER, UNC/ACR, UNC/HbA1c, и UNC/TG. Проведеният ROC анализ показва диагностична ефективност от 89% за правилно идентифициране на пациентите със ЗД тип I с албуминурия при cut-off за UNC = 47.85 ng/mL.

За да се определи значението на pNGAL и UNC за поставяне на диагнозата на ДБЗ при пациенти със ЗД I, дефинирано като ACR > 3g/mol, е проведен логистичен регресионен анализ, който коректно диагностицира 90% от пациентите със ЗД I спрямо наличието бъбречно увреждане (99% от пациентите без ДБЗ и 67% от пациентите с ДБЗ). Когато и двата маркера се отчитат едновременно, те значимо прогнозира наличието на ДБЗ, като UNC е по-същественият за прогнозата – повишението на UNC с 1 µg/mmol увеличава шанса пациент със ЗД I да има ДБЗ с 2.1 пъти.

Дискусията е добре онагледена и показва завидното умение на дисертанта за обсъждане на собствените резултати, съпоставяйки ги с известните факти в релевантната литература, и интерпретирайки ги адекватно, за да направи важни изводи за установените находки и тяхното значение за клиничната практика.

1. *Верифициране на имунотурбидиметричен метод за определяне на NGAL.*

Аргументирана е необходимостта от верифициране и валидиране на метода, избран за определяне на NGAL. Достоверно установената по-ниска стойност за LLOQ = 12 ng/mL дава сигурност на изследователския екип за получаване на качествени резултати за проби с ниски стойности на NGAL. Използвани са коректни методи за анализ на съвкупността от параметри, характеризиращи аналитичната надеждност, и след прилагане на адекватна статистическата обработка докторантът убедително доказва, че методът е с много добри аналитични характеристики.

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

а) *в плазма* – направено е сравнение с проучвания, при които референтните граници на pNGAL са определени с помощта на метода PETA/Biorpoto. Въпреки използването на различни видове биологичен материал (EDTA плазма и серум), резултатите от настоящия труд са напълно сравними с тези от посочените проучвания. Доказано е статистически значимо възрастово различие за индивиди над и под 60-годишна възраст.

б) *в урина* – посочени и дискутирани са различията в РГ за uNGAL и UNC в литературата в зависимост от видовете урина (диурезна, първа сутрешна и случайна), както и зависимостта им от метода за определяне на NGAL и представянето им в различни мерни единици, добре илюстрирани в таблици 30 и 31. Аргументира се както избора на биологичен материал (първа сутрешна урина, възприет стандарт за рутинен уринен анализ), така и необходимостта от изчисляване на съотношението UNC. При стриктно спазване на изискванията са определени РГ за нашата популация. Не са установени полови различия за uNGAL, но при нормализиране на резултатите (представени като UNC) се достига до статистическа значимост. Формираните полови зависими РГ са сравними с тези от литературните източници, които са използвали същия метод, вид урина и мерни единици.

Докторантът обръща внимание и на факта, че при интерпретиране на резултати за UNC, винаги трябва да се отчитат състояния, при които има променена екскреция на креатинин, която невинаги следва тази на NGAL (напр. ОБУ и бъбречна трансплантация).

3. *Референтни граници на NGAL при деца. Биологична вариация*

а) *в плазма* – литературните източници относно РГ за pNGAL при деца са малко, но въпреки това, когато се вземат под внимание аналитичния метод и вида на плазмата, се вижда, че няма съществени различия между РГ, определени в настоящото проучване, и тези, цитирани в литературата.

б) *в урина* – за uNGAL, определян в детска възраст, има малко повече данни, но резултатите са получени с различни аналитични методи и различни видове урина (основно случайна порция), което обяснява наблюдаваните леки различия в РГ при различните проучвания. При проучвания с по-голям брой участници са установени възрастово и полови зависими РГ. Изразяването на UNC в различни мерни единици е допълнителен фактор, изясняващ различията в РГ в детска възраст. При някои проучвания с по-голям брой деца е било възможно и определяне на възрастово и

полово зависими РГ, при което се установява снижение на стойностите с възрастта и по-високи стойности при момичета, което се обяснява с променящите се с възрастта и пола стойности на креатинин в урината. Пред вид установената отрицателна, но все още статистически незначима корелация между UNC и възрастта, е съвсем коректно заключението на докторанта за необходимостта от включване на допълнителни деца на различна възраст, за да се оценят физиологичните възрастово обусловени промени в стойностите за UNC при деца.

4. *Диагностична надеждност на NGAL при диагностиката на ДБЗ при ЗД тип II*

По отношение на pNGAL е направен аргументиран извод от резултатите, че той е маркер за оценка на гломерулната филтрация. Не е установена корелационна връзка с ACR, като статистически значимо по-високи резултати спрямо контролната група имат единствено пациентите в АЗ в съответствие с очакваното по-тежко бъбречно увреждане и по-силно намалената гломерулна филтрация. Коментирани са резултати и от други проучвания, но се подчертава фактът, че сравнение между тях не е удачно да се прави, поради методологични и други различия. В естествения ход на бъбречното увреждане при ЗД, понижението на eGFR е най-често късен индикатор за наличие на ДБЗ и биомаркери, които корелират само с понижението на eGFR, но не и с албуминурията, не са подходящи за диагностика на ДБЗ. Изведен е логичен извод, че самостоятелното използване на pNGAL няма необходимата ефективност за рутинна диагностика на ДБЗ при пациенти със ЗД II.

По отношение на уринните параметри uNGAL и UNC, резултатите от настоящото проучване са убедителни относно връзката им с албуминовата екскреция – нивата им сигнификантно се повишават паралелно с увеличаване на степента на албуминурията, като това е по-отчетливо подчертано за UNC. При него се постига и статистическа значима разлика дори между пациентите с нормалбуминурия (A1) и контролната група. Логична е позитивната им корелационна връзка с ACR. Тези зависимости са в съгласие с множество литературни източници. Само в един от тях [177] не е установена позитивна корелационна зависимост между ACR и uNGAL и би било интересно какво е обяснението на този факт. Един от основните критерии за класифициране на пациентите със ЗД II в две основни групи (без или със ДБЗ) е отсъствие или наличие на албуминурия и е логичен резултатът за статистически значими различия за тези два уринни параметри при двете изследвани групи, както и достигнатата сигнификантна разлика за UNC между ЗД без ДБЗ и контролната група. Резултатите от настоящото

проучване са в подкрепа на идеята, че NGAL като маркер за тубулоинтерстициално увреждане може да установи развитието на ДБЗ преди неговото диагностициране посредством повишената AER. Обобщена е диагностичната ефективност на тези показатели в разграничаване на пациентите с ДБЗ сред лицата със ЗД II при така определените cut-off стойности, посочени в раздел резултати.

5. *NGAL като маркер за прогресия на ДБЗ при пациенти със ЗД тип II*

Предоставени са факти от множество изследвания относно pNGAL, uNGAL и UNC, които водят до заключението, че тубулното увреждане играе решаваща роля в прогресията на ДБЗ и развитието му до терминален стадий. Всичко това умело е доказано и в настоящия дисертационен труд посредством установените корелационни зависимости между pNGAL и понижената гломерулна филтрация (единият от критериите за стратификация на ДБЗ), позитивната корелация между UNC и ACR (другият от критериите за стратификация на ДБЗ), доказването че едновременното използване на резултатите за pNGAL и UNC сигнификантно прогнозира тежестта на ДБЗ. В съответствие със схващането, че кумулативната гликемична експозиция е основен рисков фактор за развитието на ДБЗ, са предоставени данни за сигнификантната корелация между UNC и HbA1c, най-вероятно израз на по-тежко бъбречно увреждане при пациенти с лош гликемичен контрол.

6. *NGAL маркер за диагноза и прогноза на ДБЗ при пациенти със ЗД тип I*

Адекватната статистическа обработка на данните показва, че pNGAL е подходящ маркер за отдиференциране на пациентите със ЗД тип I с леко понижена гломерулна филтрация. Два факта определят невъзможността да се изследва pNGAL за оценка ролята на гломерулната хиперфилтрация – малък брой пациенти с $eGFR(CKD-EPI40) \geq 120 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ и очаквани ниски стойности за $pNGAL < LLOQ$ на използвания метод. Така коректно са уточнени причините да не се оцени ролята на маркера за диагностиката на този най-ранен стадий на бъбречното увреждане при ЗД тип I.

Докато в няколко проучвания с деца със ЗД I са установени повишени стойности на pNGAL дори при нормалбуминурия и положителна корелация с ACR, а в други отрицателна с GFR, то в настоящото проучване е установена единствено отрицателна корелация с $eGFR(CKD-EPI40)$. Някои от авторите лансират идеята, че нормалната AER при диабетици не изключва наличието на ДБЗ и посочват pNGAL като почувствителен маркер от AER за оценка на бъбречната функция при деца със ЗД.

Данните за uNGAL и UNC като маркери за идентифициране на деца с повишен ACR и за откриване на ДБЗ сред пациентите със ЗД тип I, представени в дисертационния труд, са по-категорични и са в съответствие с множество резултати от литературата, установяващи положителна корелация между uNGAL и UNC с ACR и сочещи предиктивната им стойност за диагностиката на ДБЗ. Докторантът доказва висока диагностична ефективност за uNGAL и UNC при cut-off стойности 47.85 ng/ml и 3.86 µg/mmol съответно.

Чрез статистическа обработка на данните на отпадналите от проучването петима участници със ЗД II и трима със ЗД I, поради налична ИПП и левкоцитурия, докторантът изказва напълно уместна и обоснована препоръка при интерпретирането на резултати за uNGAL и UNC да се отчита влиянието на левкоцитурията и ИПП.

В края на дискусията се обобщава, че резултатите от дисертационния труд недвусмислено представят NGAL като обещаващ маркер, ценен за диагностиката на ДБЗ. Отчетени са и някои ограничения и лимитиращи фактори при провеждането на научното проучване, което доказва не само критичното мислене на докторанта, но и пълната му откровеност и честност, които би трябвало да са характеристики на всеки един учен.

Изводите, изведени на базата на получените резултати, са **13** на брой. Те са логични и правилно формулирани и отговарят на поставените цел и задачи.

Посочени са **приноси с теоретичен характер (7 на брой) и приноси с практико-приложен характер (7 на брой)**, които приемам напълно.

Авторефератът е изложен на 80 страници и отговаря по структура на общоприетите изисквания. В него са представени най-важните изследвания, резултати и обсъждания, отразяващи работата по дисертационния труд.

Публикации, свързани с дисертационния труд

Представени са 2 пълнотекстови оригинални статии, свързани с темата на дисертационния труд и публикувани в едно българско нереферирано списание и в едно реферирано в Scopus българско списание. Докторантът е участвал в два международни научни форума, на които е представил 2 постера, включващи част от резултатите от проучванията по дисертационния труд.

Заклучение

По структура, обем и съдържание представеният ми за рецензия дисертационен труд съответства напълно на нормативните изисквания. Той е свързан със социално-

значимо заболяване и представлява собствена разработка на докторанта по актуален научно-медицински проблем. Поставените задачи, напълно съобразени с целта на проучването, са успешно реализирани. Получените резултати са задълбочено обсъдени и водят до формулиране на точни и ясни изводи. Съгласна съм с изтъкнатите приноси с теоретичен и с практико-приложен характер.

Всичко това ми дава основание да изразя напълно убедено своята **положителна оценка** и да препоръчам на уважаемото Научно жури да присъди на д-р Севим Ахмед Шефкет научно-образователната степен “**доктор**“ по докторска програма „Клинична лаборатория“.

28.04.2022 г.
гр. Варна

Изготвил рецензия:


/доц. д-р Даниела Иванова Герова, дм/