



АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

А.А. Мельник, к.б.н.

NGAL — липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, — новый биомаркер для ранней диагностики острого повреждения почек

Острое повреждение почек (ОПП) — это синдром, характеризующийся быстрым (часы, дни) потенциально обратимым повреждением почечной паренхимы различной этиологии, накоплением креатинина, мочевины и других продуктов метаболизма с/без снижения экскреторной функции почек, который сопровождается олигурией с задержкой натрия и воды, а также развитием кардиоваскулярных, легочных, желудочно-кишечных, неврологических, гематологических и других осложнений.

Проведенные в последнее время исследования показывают, что ОПП развивается у 3,2–9,6% госпитализированных больных. При этом госпитальная смертность составляет 20%, в отделениях интенсивной терапии данный показатель достигает 50%. Отмечается также повышение отдаленной смертности среди пациентов с ОПП, выписанных из стационара. ОПП, требующее проведения заместительной почечной терапии (ЗПТ), развивается у 5–6% пациентов, находящихся в отделениях интенсивной терапии, при этом госпитальная смертность возрастает до 60%. Ежегодно приблизительно 2 млн человек в мире умирают от ОПП. Частота случаев ОПП в общей популяции составляет от 180 до 280 на 1 млн населения и неуклонно увеличивается.

Ранее ОПП обозначалось термином «острая почечная недостаточность». Первое описание острой почечной недостаточности (ОПН) было опубликовано в 1802 г. W. Herberden. В начале XX в. (1909 г.) W. Osler подробно описал ОПН (названную в последующем Брайтовой болезнью) как результат воздействия токсических веществ, беременности, родов, травм или операций на почках [1]. Во время Первой мировой войны синдром ОПН получил название «военный нефрит» и был описан во многих публикациях [2]. Это название не использовалось до начала Второй мировой войны, когда E.G. Wywaters и D. Beall опубликовали свой классический труд, посвященный синдрому длительного сдавливания [3]. Считается, что заслуга внедрения термина «острая почечная недостаточность» принадлежит H.W. Smith, который впервые употребил его в 1951 г. в своем руководстве «Почка — строение и функция у здорового человека и при заболеваниях» в главе «Острая почечная недостаточность, связанная с травматическими поражениями» [4]. В этом же году ОПН был посвящен номер Journal of Clinical Investigation [5].

Среди специалистов до сих пор нет единого мнения относительно диагностических критериев и клинического определения ОПН, в результате чего существует множество различных вариантов — в настоящее время в литературе их встречается более 30. Это связано с различным подходом к характеристике пациентов [6], а также с большим расхождением данных о частоте возникновения (1–31%) и смертности при ОПН (28–82%) [7, 8].

В последние годы получены убедительные доказательства того, что даже небольшие изменения почечной

функции (недостаточные для того, чтобы констатировать тяжелую органную недостаточность) ассоциируются с увеличением заболеваемости и летальности. По мнению M. Clarkson и соавт., широко употребляемый термин «острая почечная недостаточность» не отражает динамические процессы на этапах начала повреждения почек, его разгара и выздоровления, каждый из которых различается по степени тяжести и продолжительности, и не дает достаточно отчетливого представления о степени тяжести почечной недостаточности.

В связи с этим для разработки классификации ОПП в 2004 г. была создана группа экспертов по острой почечной дисфункции (Acute Dialysis Quality Initiative — ADQI), в состав которой вошли нефрологи и реаниматологи. Этой группой были предложены критерии RIFLE [9]. В шкале RIFLE степени нарушения функции почек разделены по тяжести — Risk (риск), Injury (повреждение), Failure (недостаточность) — и двум исходам, таким как Loss (потеря функции) и End Stage Kidney Disease (терминальная почечная недостаточность). Три степени тяжести определяют на основе динамики креатинина сыворотки крови и количества выделяемой мочи. Исходы (Loss и End Stage Kidney Disease) определяют по продолжительности отсутствия функции почек (рис. 1).

В 2007 г. Рабочая группа международного консорциума AKIN (Acute Kidney Injury Network) модифицировала критерии RIFLE [22], а также предложила использовать термин «острое повреждение почек» вместо термина «острая почечная недостаточность» с целью отображения полного спектра острой почечной дисфункции. «Острое повреждение почек» — термин более широкий, чем «острая почечная недостаточность». Он призван выразить обратимую (в большинстве случаев) природу повреждения почек.

В соответствии с классификацией AKIN к категории «Риск» относят пациентов с увеличением концентрации креатинина в крови, начиная с 0,3 мг/дл, даже если это увеличение не достигает 50% от базового значения, устанавливается 48-часовой интервал времени для документирования любого критерия, пациента относят к категории «Недостаточность» в случае применения ЗПТ независимо от концентрации сывороточного креатинина и количества мочи к моменту начала ЗПТ. Предложено также вместо стадий R, I и F использовать цифры 1, 2, 3.

В настоящее время термин «острое повреждение почек» используют для обозначения любого спектра острого нарушения функции почек и рассматривают более приемлемым для обозначения синдрома, ранее обозначаемого как «острая почечная недостаточность», поскольку он охватывает более широкий спектр клинических и лабораторных проявлений.

Критерии RIFLE имеют некоторые ограничения:

- не учитываются степень тяжести предшествующей патологии и патогенез почечного повреждения;
- в большинстве случаев неизвестно базовое значение сывороточного креатинина;
- уровень креатинина может варьировать в широком диапазоне в зависимости от многих неренальных факторов (возраста пациента, пола, расовой принадлежности, мышечной массы, физической нагрузки, характера питания, инфекций, приема лекарственных препаратов и т. д.);
- дисфункция <50% нефронов может не отражаться на значениях креатининемии;
- не учитываются изменение диуреза и возможная обструкция при использовании диуретиков.

Несмотря на улучшение понимания патогенеза ОПП, многие аспекты в изучении этой патологии остаются дискуссионными и не соответствуют современным представлениям. Помимо сильного независимого влияния на смертность, ОПП связана со значительным увеличением срока госпитализации и высокой стоимостью лечения.

В таблице 1 представлены факторы риска развития ОПП.

Основными задачами при ОПП являются ранняя диагностика и своевременное начало лечения.

Новые биомаркеры ОПП

Совершенствование методов диагностики и оценки прогноза ОПП связано с выявлением биомаркеров, ассоциированных с ранней стадией ОПП и не зависящих от фильтрационной функции почек [10]. Биомаркеры представляют собой соединения, продуцируемые в канальцевом эпителии почек в условиях ОПП и в повышенном количестве выделяемые в мочу. В последние несколько лет все большее внимание привлекает возможность использования таких биомаркеров в диагностике ОПП.

Используемый до настоящего времени как показатель ОПП креатинин отражает функции почки, а не ее повреждение. Нечувствительность сывороточного креатинина на ранних стадиях ОПП — основная причина поиска и изучения ранних маркеров почки, которые экспрессируются в ответ на повреждение и более чувствительны и специфичны для ОПП, чем существующие диагностические тесты.

Существуют различные типы биомаркеров при ОПП. Выделяют функциональные маркеры, низкомолекулярные белки и тубулярные ферменты (табл. 2).



Рис. 1. Классификация выраженности ОПП по шкале RIFLE

Таблица 1. Факторы риска развития ОПП

• Сепсис	• Кардиохирургические вмешательства
• Шок	• Беременность
• Хроническая болезнь почек (<60 мл/мин/1,73 м ²)	• Множественная миелома
• Травма	• Повреждение трансплантатов почки
• Аутоиммунные заболевания	• Нарушение электролитного баланса
• Сахарный диабет	• Гипоальбуминемия
• Сердечная недостаточность	• Ренальная дисфункция при трансплантации печени
• Гемотрансфузии	• Острый инфаркт миокарда
• Нефротоксические препараты	• Пожилой возраст (старше 75 лет)

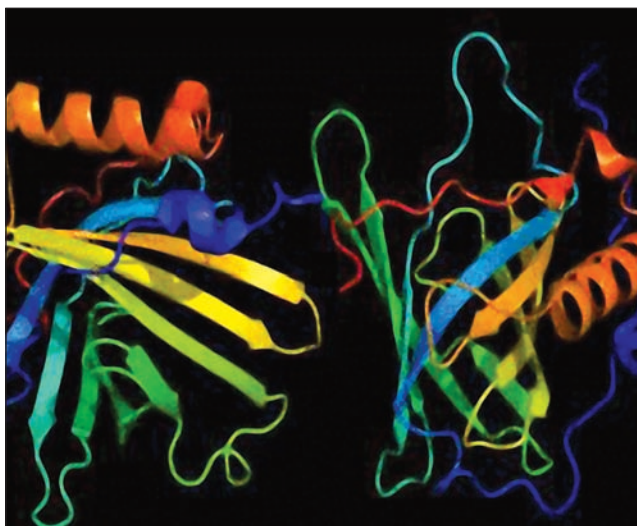
Таблиця 2. Различные типы биомаркеров в диагностике ОПП

Тип биомаркера	Биомаркеры
Функциональные маркеры	Креатинин сыворотки Цистатин С сыворотки
Низкомолекулярные белки	Цистатин С мочи KIM-1 (молекула повреждения почек-1) Интерлейкин-18 NGAL Белок, связывающий жирные кислоты
Тубулярные ферменты	α -Глутатион-S-трансфераза γ -Глутамилтранспептидаза и щелочная фосфатаза N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза

К наиболее изученным биомаркерам относятся липокалин, ассоциированный с желатиной нейтрофилов (NGAL), молекула повреждения почек-1 (KIM-1), интерлейкин-18, белок, связывающий жирные кислоты (L-FABP), цистатин С, Na^+/H^+ -обменник типа 3 (NHE-3), ряд ферментов, обычно локализующихся в щеточной кайме проксимальных канальцев, и др.

NGAL

В 1993 г. был открыт белок NGAL – липокалин, ассоциированный с желатиной нейтрофилов (липокалин-2, сидерокалин, 24p33) [20], который вскоре получил признание нефрологов в качестве маркера ОПП. NGAL человека состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 178 аминокислотных остатков. Белок освобождается из гранул нейтрофилов в виде мономера, гомо- и гетеродимера, связан с матричной металлопротеиназой-9 (желатиной-В) и имеет молекулярную массу 25 кДа (рис. 2).


Рис. 2. Структура NGAL

Липокалины представляют собой семейство небольших (160-180 аминокислотных остатков) секретиремых транспортных белков с характерной вторичной структурой. Они содержат 8 антипараллельных пептидных участков на основе β -складчатой структуры, которые формируют «липокалиновый карман».

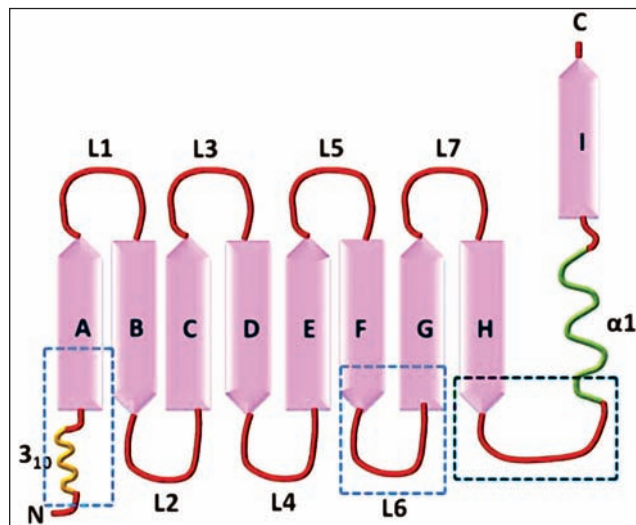
«Липокалиновый карман» является характерной особенностью липокалинов. Он состоит из N-терминальной спирали 3_{10} , за которой следуют 8 β -антипараллельных пептидных участков. Восьмая β -цепь соединена с α -цепью (обозначается как $\alpha 1$), которая, в свою очередь, соединена с C-терминальным β -концом. β -Концы соединены с петлями (L1-L7). Петли L1, L3, L5 и L7 образуют открытую область молекулы (т. е. открытый лигандсвязывающий сайт) (рис. 3).

«Липокалиновый карман» способен специфически связывать малые гидрофобные молекулы (стероидные гормоны, витамины, феромоны, простагландины, ретиноиды, арахидоновую кислоту, жирные кислоты, сидерофоры и другие активные вещества).

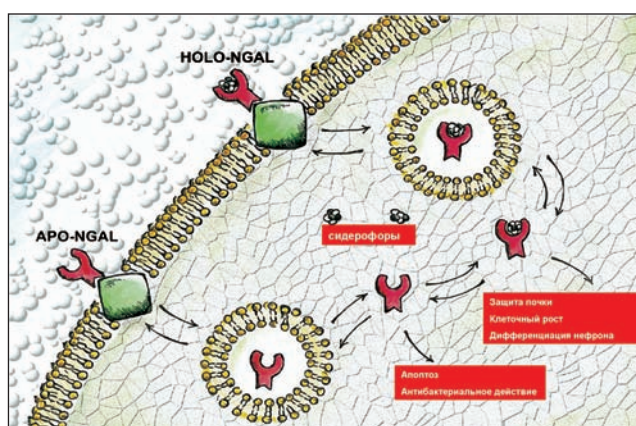
Сидерофоры – низкомолекулярные вещества, синтезируемые при дефиците железа и выделяемые многими микроорганизмами, которые специфически хелатируют железо (III) с образованием прочных комплексов.

NGAL связывает бактериальные сидерофоры и тем самым ограничивает потребление железа бактериями и регулирует потребление железа клетками организма.

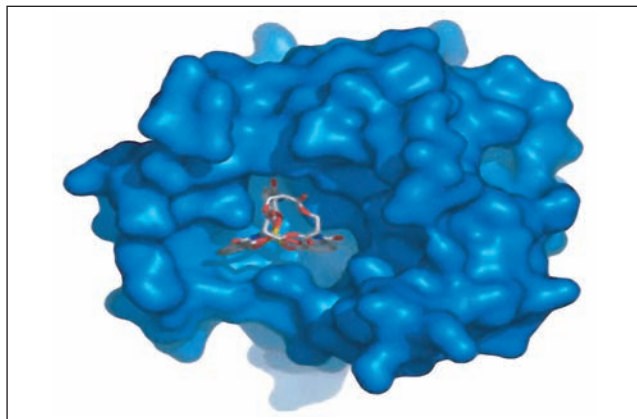
Связывание с сидерофорами происходит за счет специфического углубления в структуре молекулы («липокалинового кармана»), после чего образуются соответствующие макромолекулярные комплексы, имеющие уже определенным образом измененные функциональные


Рис. 3. Схема «липокалинового кармана» (петли L1, L3, L5 и L7 являются открытым лигандсвязывающим сайтом)

характеристики. Кроме того, многие липокалины связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток. Это позволяет считать NGAL также и транспортным белком (рис. 4).


Рис. 4. Схема клеточного превращения липокалина, ассоциированного с желатиной нейтрофилов. NGAL взаимодействует со специфическими рецепторами (24p3R или мегалином) в виде комплекса с сидерофорами (HOLO-NGAL) или отдельно (APO-NGAL)

В зависимости от конкретной ситуации NGAL может быть как донором железа, что при поражении почек оказывает органопротекторное действие и стимулирует активность нефронов, а также имеет проапоптотическую активность. Как хелатор железа NGAL является ингибитором эритропоэза [21] (рис. 5).


Рис. 5. Кристаллическая структура NGAL, связанного с железом (III)

В зависимости от различных патологических состояний NGAL экспрессируется и секретируется большим количеством различных клеток, находящихся в состоянии стресса, – клетками почечных канальцев, предстательной железой, гепатоцитами, иммунными клетками, эпителиальными клетками респираторного и пищеварительного трактов.

Синтез и экскреция NGAL

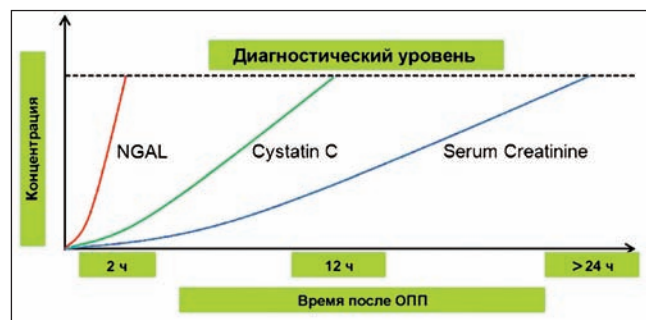
Повышение синтеза NGAL в клетках проксимальных канальцев вызывается нарушениями, связанными с ишемией почечной паренхимы и ее поражениями нефротоксическими соединениями [11-14].

В целом у человека в ответ на повреждение ренальных канальцев уровень NGAL резко увеличивается как в плазме крови (уровень сывороточного NGAL (s-NGAL) повышается в 7-16 раз), так и в моче (уровень NGAL в моче (u-NGAL) увеличивается в 25-1000 раз) [15-17] (табл. 3).

Значимое повышение концентрации креатинина по сравнению с NGAL может не выявляться, по крайней мере, в течение 24 ч после ОПП в связи со значительной инертностью этого показателя [24] (рис. 6).

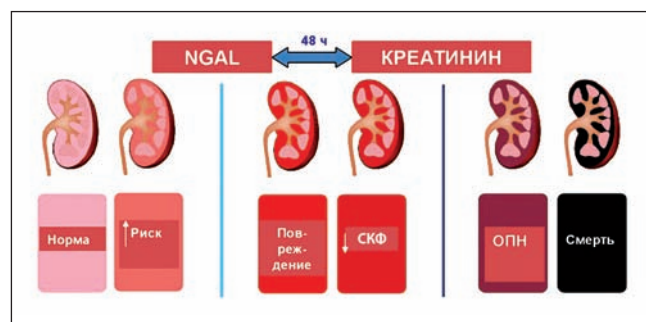
Таблиця 3. Повышение s-NGAL и u-NGAL в ответ на повреждение ренальных канальцев

Увеличение s-NGAL сыворотки в 7-16 раз	Увеличение u-NGAL мочи в 25-1000 раз
В сыворотке повышаются уровни NGAL, синтезированного вне почек	В восходящем колоне петли Генле и собирательных трубочках происходит быстрый и массовый синтез NGAL de novo, который затем определяется в моче
В почках s-NGAL фильтруется и реабсорбируется в проксимальных канальцах. Во вторичную (окончательную) мочу не попадает	Экскреция NGAL в мочу может также происходить при повреждении проксимальных канальцев
Функция при ОПП – ограничение и/или уменьшение тяжести повреждений в проксимальных канальцах	Функция при ОПП – бактериостатическая


Рис. 6. Повышение концентрации креатинина может быть зафиксировано только спустя 24 ч после ОПП

Измерение сывороточного креатинина для выработки надежного терапевтического вмешательства при ОПП бесполезно и аналогично ожиданию 2-3 дней перед началом лечения. Функция почек может быть утрачена почти на 50% еще до повышения уровня креатинина [18, 19].

При этом экскреция NGAL с мочой на 24-48 ч опережает повышение концентрации креатинина в сыворотке крови (рис. 7).


Рис. 7. NGAL на 24-48 ч опережает повышение концентрации креатинина в сыворотке крови

Функции NGAL

NGAL, прежде всего, является бактериостатиком, который образует комплексы с микробными сидерофорами, связывает железо, необходимое микроорганизмам, тормозит их рост.

Среди функций NGAL – нормализация поврежденных тканей за счет участия в процессе апоптоза, повышение выживаемости поврежденных клеточных структур, восстановление поврежденного эпителия за счет стимулирования дифференцировки и структурной реорганизации почечного эпителия. В зависимости от условий NGAL может быть и фактором выживания клеток, и проапоптотическим фактором.

При патологических состояниях NGAL может стимулировать злокачественный рост, участвовать в ремоделировании атеросклеротических бляшек и миоцитов при ишемических повреждениях миокарда. NGAL связан с такими видами опухолей, как рак грудной железы, яичника, колоректальный рак и рак поджелудочной железы. Функции при неогенезе не известны, хотя он угнетает инвазивный рост и метастазирование в моделях рака грудной железы и колоректального рака.

При ОПП источниками высоких уровней s-NGAL являются печень, легкие, нейтрофилы, макрофаги и другие клетки иммунной системы. Оказалось, что хотя s-NGAL свободно фильтруется клубочками, он в большой степени реабсорбируется в проксимальных канальцах за счет эндоцитоза. Показано, что при ОПП происходит быстрое увеличение более чем в 1000 раз синтеза мРНК, кодирующей u-NGAL, в восходящем колоне петли Генле и собирательных трубочках. По этой причине в моче преобладает пул NGAL, синтезируемый в почках, который не поступает в систему кровообращения, а полностью экскретируется в мочу.

Продолжение на стр. 46.



АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

А.А. Мельник, к.б.н.

NGAL — липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, — новый биомаркер для ранней диагностики острого повреждения почек

Продолжение. Начало на стр. 44.

Повышение концентрации NGAL в моче наблюдается при ОПП, остром тубулярном некрозе или тубулоинтерстициальной нефропатии. Изучение причин и механизмов повышения уровня NGAL в сыворотке крови и моче послужило основой для разработки метода ранней диагностики ОПП.

Измерение NGAL

Для количественного определения NGAL в настоящее время используются различные типы анализаторов, наборы и тест-системы. Основные мировые компании-производители (табл. 4):

1. Abbott Diagnostics (США);
2. BioSite (США);
3. BioPorte (Дания).

Референсные значения

Пограничные уровни NGAL, позволяющие с оптимальной чувствительностью и специфичностью определить ОПП и установленные в разных исследованиях у пациентов с ОПП различной этиологии, находятся в диапазоне 100–270 нг/мл. Для рутинного измерения NGAL с целью диагностики и оценки прогноза ОПП рекомендуется пограничный уровень NGAL, составляющий 150 нг/мл [23].

NGAL может быть использован для оценки тяжести ОПП при сепсисе и с целью диагностики таких состояний, как:

- хронические заболевания почек;
- диабетическая нефропатия;
- инфекции мочевого тракта;
- волчаночный нефрит;

Таблица 4. Основные мировые компании-производители анализаторов и наборов для количественного определения NGAL				
Анализатор	Architect (i1000/i2000 SR)	Triage® MeterPro™	Ридеры для считывания с микропланшета	Биохимические автоматические анализаторы: Roche, Siemens, Abbott, Beckman Coulter
Название набора/тест-системы	Architect Urine NGAL	Triage NGAL Test	NGAL Rapid Elisa Kit	NGAL Test Reagent Kit
Название компании	Abbott A Promise for Life	BIOSITE NEW DIMENSIONS IN DIAGNOSTICS®	BIOPORTO® Diagnostics	BIOPORTO® Diagnostics
Страна-производитель	США	США	Дания	Дания
Метод	Гетерогенный иммунный анализ	Point of care (иммунофлуоресценция)	ELISA	Иммунотурбидиметрический
Время измерения	15 мин	15 мин	45 мин	15 мин
Образец	Моча	Плазма	Моча, плазма, сыворотка	Моча, плазма
Референсные значения	<131,7 нг/мл	Мужчины – 18–196 нг/мл; женщины – 35–151 нг/мл		Моча – 0,7–9,8 нг/мл; плазма – 37–106 нг/мл

- повреждение трансплантированной почки;
- отсроченная функция трансплантата и необходимость диализа;
- ренальная дисфункция при трансплантации печени;
- ишемические ренальные повреждения при операциях, связанных с применением аппарата искусственного кровообращения;

- нефропатии, индуцированные контрастными веществами при чрескожном коронарном вмешательстве;
- ОПП, связанное с множественными травмами.

Список литературы находится в редакции.



ФИЛАТОВСКИЕ ЧТЕНИЯ 2015

посвященные 140-летию
со дня рождения академика В.П. Филатова



21-22 мая 2015
Одесса, Украина

Организаторы:

Общество офтальмологов Украины
ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии
им. В.П. Филатова НАМН Украины»

При поддержке:

Национальной академии медицинских наук Украины
Министерства здравоохранения Украины

Место проведения:

Институт им. В.П.Филатова

Оргкомитет:

Сайт: www.tou.org.ua
Телефоны: +380487465208; +380661466070
E-mail: filatovinstitut@ukr.net

АНОНС

Українське наукове медичне товариство оториноларингологів

XII з'їзд оториноларингологів України

18-20 травня, м. Львів

Місце проведення: Національний академічний український драматичний театр
ім. Марії Заньковецької (вул. Лесі Українки, 1).

Форми участі: усна доповідь; стендова доповідь; публікація тез.

Організаційний внесок (50 у. о. при оплаті до 1 квітня, 70 у. о. — після 1 квітня;
25 у. о. для молодих спеціалістів; за курсом Національного банку України на день
сплати) включає участь у науковій програмі, відвідування виставки, отримання
матеріалів з'їзду, фуршет, екскурсію у день заїзду. Проживання та товариська
вечера оплачуються окремо.

Реквізити для сплати оргвнеску: Українське наукове медичне товариство
оториноларингологів, код ЗКПО 23697446, банк ГУ по м. Києву та Київській
області ТББВ № 10026/0187 АТ «Ощадбанк»; р/р 26002300601155, МФО 322669
(з поміткою «Оргвнесок» або «Друк тез»).

Для довідок: тел.: (044) 483-12-82; тел./факс: (044) 483-15-80;
e-mail: amt@kndio.kiev.ua; kholodenko@list.ru

Більш докладну інформацію про з'їзд розміщено на сайті Українського
наукового медичного товариства оториноларингологів: www.ents.com.ua