

NGAL – ЛИПОКАЛИН, АССОЦИИРОВАННЫЙ С ЖЕЛАТИНАЗОЙ НЕЙТРОФИЛОВ – НОВЫЙ БИОМАРКЕР ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

Мельник А.А., к.б.н.

Острое повреждение почек (ОПП) – это синдром, характеризующийся быстрым (часы, дни) потенциально обратимым повреждением почечной паренхимы различной этиологии, накоплением креатинина, мочевины и др. продуктов метаболизма, со снижением или без снижения экскреторной функции почек, который сопровождается олигоанурией 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%, а смертность в отделениях интенсивной терапии достигает 50%. Отмечается также повышение отдаленной смертности среди пациентов с ОПП, выписанных из стационара. Острое почечное повреждение, требующее заместительной почечной терапии (ЗПТ), развивается у 5–6% пациентов в отделениях интенсивной терапии, при этом госпитальная смертность возрастает до 60%. Ежегодно примерно 2 миллиона 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 называлось острая почечная недостаточность (ОПН). Первое описание ОПН или *ischemia renals* было дано в 1802 году W. Herberden. В начале прошлого века (1909 г.) W.Osler подробно описал ОПН (названную затем Брайтовой болезнью) как результат воздействия токсических веществ, беременности, родов, травм или операций на почках (1). Во время первой мировой войны синдром ОПН получил название военного нефрита или простудного нефрита и был описан во многих публикациях (2). Это название было забыто до начала второй мировой войны, когда Bywaters и Beall опубликовали свой классический труд, посвященный синдрому длительного сдавливания (3). Считается, что заслуга внедрения термина ОПН принадлежит H.W.Smith, который впервые употребил его в 1951 году в своем руководстве «Почка – строение и функция у здорового человека и при заболеваниях» (1951) в главе «Острая почечная недостаточность, связанная с травматическими поражениями» (4). В том же году ОПН был посвящен целый номер в *Journal of Clinical Investigation* (5).

Среди специалистов до сих пор нет согласия относительно диагностических критериев и клинического определения ОПН, в результате чего существует множество различных определений. В настоящее время в литературе их встречается более 30. Это связано с различным подходом к характеристике пациентов (6), а также 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 морбидности (болезненности) и летальности. По мнению M. Klarkson и соавторов, широко употребляемый термин «острая почечная недостаточность» не отражает адекватно динамические процессы на этапах начала повреждения почек, его разгара и выздоровления, каждый из которых различается по тяжести и продолжительности. Он не дает достаточно отчетливого представления о тяжести почечной недостаточности.

В связи с этим для разработки классификации острого повреждения почек 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 **Loss** (потеря функции) и **End Stage Kidney Disease** (терминальная почечная недостаточность). Три стадии 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).



Рис. 1. Классификация выраженности острого повреждения почек RIFLE.

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. ОПП – термин более широкий, чем ОПН. Он призван выразить обратимую природу повреждения почек в большинстве случаев.

В соответствии с модификацией RIFLE в классификации 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 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 ОПП используют для обозначения любого спектра острого нарушения функции почек и рассматривают более приемлемым для обозначения синдрома, ранее называемого ОПН. Это связано с тем, чтобы подчеркнуть более широкий спектр клинических и лабораторных проявлений при ОПП, чем при ранее обозначаемой ОПН.

Хотя частота ОПП, определенная по критериям RIFLE намного выше (в 2-10 раз), чем частота ОПП по другим критериям, критерии RIFLE имеют свои ограничения:

1. Не учитываются тяжесть предшествующей патологии и патогенез почечного повреждения;
2. В большинстве случаев не известно базовое значение сывороточного креатинина;
3. Уровень креатинина может варьировать в широком диапазоне в зависимости от многих не ренальных факторов (возраст пациента, пол, раса, мышечная масса, физическая нагрузка, характер питания, инфекции, прием лекарственных препаратов и т.д.);
4. Дисфункция менее 50% нефронов может вообще не отражаться на значениях креатининемии;

5. Не учитывает использование диуретиков;
6. Не учитывает возможную обструкцию при использовании диуретиков

Несмотря на улучшение понимания патогенеза ОПП, многие аспекты в понимании 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.

Факторами риска развития ОПП могут быть следующие (Табл. 1):

1.	Сепсис	10.	Кардиохирургические вмешательства
2.	Шок	11.	Беременность
3	Хроническая болезнь почек (<60 мл/мин/1.73 м ²)	12.	Множественная миелома
4.	Травма	13.	Повреждение трансплантатов почки
5.	Аутоиммунные заболевания	14.	Нарушение электролитного баланса
6.	Сахарный диабет	15.	Гипоальбуминемия
7.	Сердечная недостаточность	16.	Ренальная дисфункция при трансплантации печени
8.	Гемотрансфузии	17.	Острый инфаркт миокарда
9.	Нефротоксические лекарства	18.	Пожилой возраст (старше 75 лет)

Табл.1. Факторы риска развития ОПП.

Поэтому ранняя диагностика и, соответственно, своевременное начало лечения являются основными задачами при ОПП.

Новые биомаркеры ОПП

Совершенствование методов диагностики и прогнозирования ОПП связано с обнаружением 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 повышенных количествах выделяемые в мочу. В последние несколько лет все большее внимание привлекает возможность использования таких биомаркеров в диагностике острого повреждения почек.

Используемый до настоящего времени как показатель ОПП креатинин отражает функции почки, а не ее повреждения. Проблема нечувствительности 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. Они дифференцируются на функциональные маркеры, низкомолекулярные белки, тубулярные ферменты (табл.2).

Тип Биомаркера		Биомаркеры	
1	Функциональные маркеры	а	Креатинин сыворотки
		б	Цистатин С сыворотки
2.	Низкомолекулярные белки	а	Цистатин С мочи
		б	KIM-1 (молекула-1 повреждения почек)
		в	Интерлейкин 18
		г	NGAL
		д	Белок , связывающий жирные кислоты печени
3.	Тубулярные ферменты	а	Альфа-глутатион-s-трансфераза

		б	Гамма-глутамилтранспептидаза и щелочная фосфатаза
		в	N-ацетил-бета—D-глюкозаминидаза

Табл.2. Различные типы биомаркеров в диагностике ОПП

К наиболее изученным биомаркерам, относятся липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), молекула-1 повреждения почек (KIM-1), интерлейкин-18, белок, связывающий жирные кислоты печени (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 году был открыт белок NGAL - липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (другие названия липокалин-2, сидерокалин, 24p33 или LCN2) (20), который вскоре получил признание нефрологов в качестве маркера острого повреждения почек. NGAL человека состоит из одной полипептидной цепи, состоящей из 178 аминокислотных остатков. Освобождается из гранул нейтрофилов в виде мономера, гомодимера и гетеродимера, связан с матриксной металлопротеиназой 9 (желатиназа В) и имеет молекулярную массу 25 кДа (рис.2).



Рис. 2. Структура NGAL

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

Характерной особенностью липокалинов является «липокалиновый карман», который состоит из N-терминальной 3-10 спирали за которой следуют 8 бета антипараллельных пептидных участка. Восьмая бета цепь соединена с альфа цепью (обозначается как альфа1), которая в свою очередь соединена с С-терминальным бета концом. Бета концы соединены с петлями (L1-L7). Петли L1, L3, L5 и L7 образуют открытую область молекулы (т.е. открытый лиганд-связывающий сайт) (рис. 3).

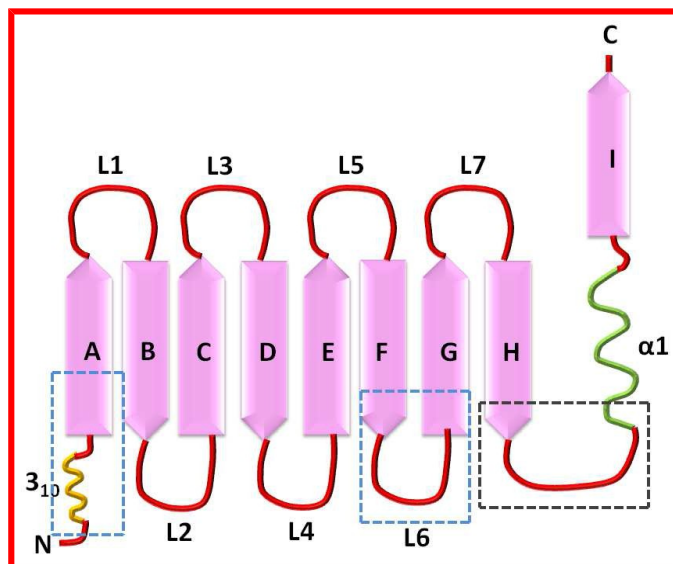


Рис. 3. Схема «липокаринового кармана» (петли L1, L3, L5 и L7 являются открытым лиганд-связывающим сайтом).

«Липокариновый 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 («липокаринового кармана») после чего образуются соответствующие макромолекулярные комплексы, имеющие уже определенным образом измененные функциональные характеристики. Кроме того, многие липокарины связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток. Это позволяет считать NGAL также и транспортным белком (рис.4).

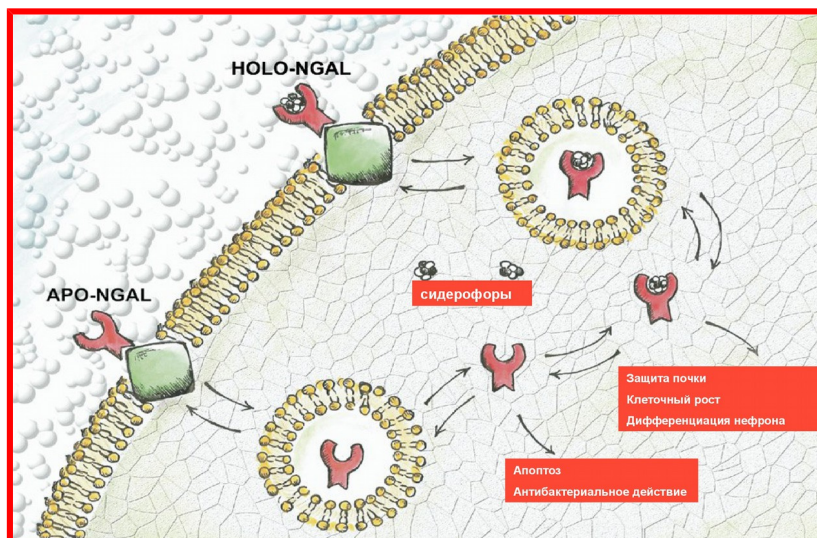


Рис.4. Схема клеточного превращения липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов. NGAL взаимодействует со специфическими рецепторами (24p3R или мегалином) в виде комплекса с сидерофорами (HOLO- NGAL) или отдельно (APO-NGAL).

В зависимости от конкретной ситуации, NGAL может быть как донором железа, что при поражении почек оказывает ренально-протективное действие и стимулирует нефрон-индуцирующую активность, а также иметь про-апоптозную активность. Как хелатор железа NGAL – ингибитор эритропоэза **(21)** (рис.5).

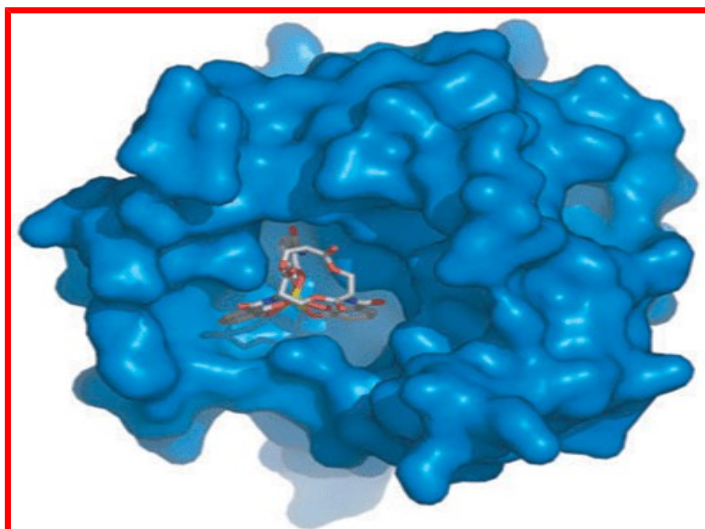


Рис. 5. Кристаллическая структура NGAL, связанного с Fe (III).

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

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 возрастает 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).

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 в собирательных трубках происходит быстрый и массовый синтез NGAL de novo, который затем оказывается в моче.
В почках s-NGAL фильтруется и реабсорбируется в проксимальных канальцах.	Экскреция NGAL в мочу может также происходить при повреждении проксимальных канальцев.
В окончательную мочу не попадает.	
Функция при ОПП – ограничение и/или уменьшение тяжести повреждений в проксимальных канальцах.	Функция при ОПП – бактериостатическая

Табл.3. Повышение NGAL сыворотки (s-NGAL) и мочи (u-NGAL) в ответ на повреждение ренальных канальцев.

Значимое увеличение концентрации креатинина по сравнению с NGAL может не выявляться, по крайней мере, в течение 24 часов после острого повреждения почек в связи со значительной «инерционностью» этого показателя (24) (Рис.6).

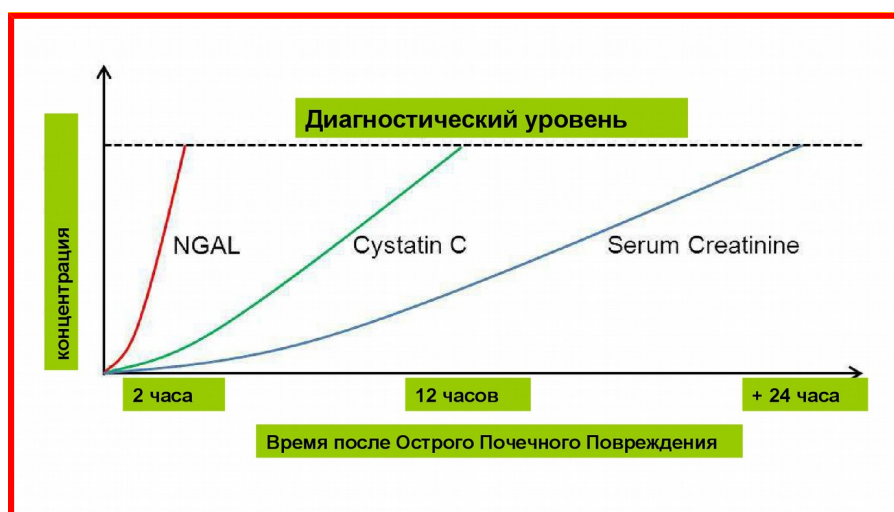


Рис. 6. Увеличение концентрации креатинина может быть зафиксировано только спустя 24 ч после ОПП.

Измерение сывороточного креатинина для выработки надежного терапевтического вмешательства при ОПП бесполезно и аналогично ожиданию 2-3 дней перед началом терапии пациентов. До 50% функций почек может быть утрачено еще до повышения креатинина (18,19).

При этом экскреция NGAL с мочой на 24–48 часов опережает повышение концентрации креатинина в сыворотке крови (Рис. 6).

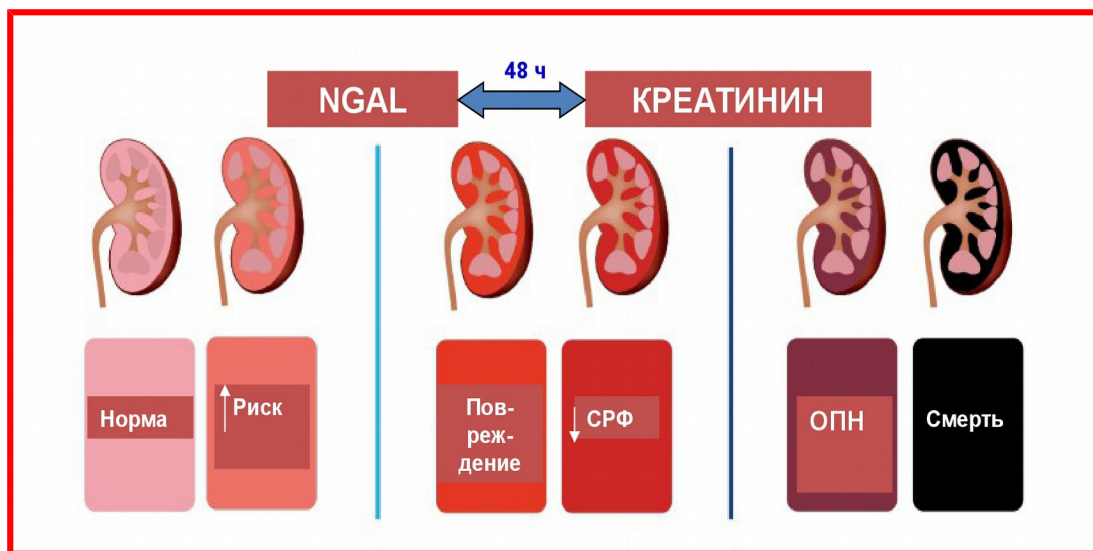


Рис.6. NGAL на 24–48 часов опережает повышение концентрации креатинина в сыворотке крови.

Функции NGAL

NGAL прежде всего является бактериостатиком, который образует комплексы с микробными сидерофорами, связывает железо, необходимое микробам и тормозит их рост. Вторая важная функция – нормализация поврежденных тканей за счет участия в процессе апоптоза, повышения выживаемости поврежденных клеточных структур, восстановления поврежденного эпителия за счет стимулирования дифференцировки и структурной

реорганизации ренальных эпителиальных клеток. В зависимости от условий, NGAL может быть и фактором выживания клеток и про-апоптотическим фактором.

При патологических состояниях может стимулировать злокачественный рост, участвовать в ремоделировании атеросклеротических бляшек и миоцитов при ишемических повреждениях миокарда. NGAL связан с такими видами опухолей как рак груди, яичников, колоректальный рак и рак поджелудочной железы. Функции при неогенезе неизвестны, хотя он угнетает инвазивность и метастазирование в моделях рака молочной 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 1000-кратное увеличение синтеза мРНК, кодирующей u-NGAL, в восходящем колоне петли Генле и в собирательных трубках. По этой причине в моче преобладает «ренальный» пул NGAL, синтезируемый в почках, которые не поступает в систему кровообращения, а полностью экскретируется в мочу. Рост концентрации NGAL в моче наблюдается при остром почечном повреждении, остром тубулярном некрозе или тубулоинтерстициальной нефропатии. Изучение причин и механизмов повышения уровней NGAL в сыворотке крови и моче послужили основой для разработки метода ранней диагностики ОПП.

Измерение NGAL

Для количественного определения NGAL в настоящее время используются различные типы анализаторов и, соответственно, наборы и тест-системы к ним основных 3-х компаний производителей в мире (Табл.4):

1. Abbott Diagnostics (США). Гетерогенный иммуноанализ в моче.
2. BioSite (США). Point of Care в плазме.
3. BioPorte (Дания). Метод ELISA для определения в моче, сыворотке и плазме.

Название анализатора	Architect i (1000/2000 sr)	Triage® MeterPro™	Ридеры для считывания с микропланшет	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		 BIOPORTO® Diagnostics	 BIOPORTO® Diagnostics

		BIO SITE NEW DIMENSIONS IN DIAGNOSIS®		
Страна производитель	США	США	Дания	Дания
Метод	Гетерогенный иммуноанализ	Point of care (иммунофлюорес- ценция)	ELISA	Иммунотурби- диметрический
Время измерения	15 мин	15 мин	45 мин	15 мин
Образец	Моча	Плазма	Моча, плазма, сыворотка	Моча, плазма
Референтные значения	Моча: < 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

Табл.4. Основные компании-производители в мире анализаторов и наборов для определения NGAL.

Референтные значения.

Пограничные уровни NGAL, позволяющие с оптимальной чувствительностью и специфичностью предсказывать ОПП, установленные в разных исследованиях и у пациентов с ОПП разных этиологий, находятся в диапазоне 100 – 270 нг/мл. Для рутинного измерения NGAL с целью диагностики и прогнозирования ОПП рекомендуется пограничный уровень NGAL, составляющий 150 нг/мл **(23)**.

Как ранний маркер острого повреждения почек NGAL может быть использован для следующих диагностических целей:

- оценка тяжести ОПП при сепсисе;
- хронические заболевания почек;
- нефротоксичность фармацевтических препаратов;
- диабетическая нефропатия;
- инфекции мочевого тракта;
- волчаночный нефрит;
- повреждение трансплантированной почки;
- отсроченная функции трансплантата и необходимость диализа;
- ренальная дисфункция при трансплантации печени;
- ишемические ренальные повреждения при операциях, связанных с АИК;
- нефропатии, индуцированные контрастными веществами при чрескожном коронарном вмешательстве;
- ОПП, связанное с множественными травмами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ekhyan G. Emergence of the concept of acute renal failure // Am.J.Nephrol. 2002. Vol/22/ P.225-230.
2. Davies F., Weldon R. A contribution to the study of “war nephritis” // Lancet.1917.Vol.2.P.118-120.
3. Bywaters E.G., Beall D. Crush injuries with impairment of renal function // Br.Med.J. 1941. Vol.1. P. 427-432/

4. Smith H.W. The kidney – structure and function in health and disease // Oxford: Oxford University Press. 1951.
5. Oliver J., Mac O.M., Tracy A. The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury; renal, ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode// J.Clin.Invest.1951.Vol.30. P.1307-1439.
6. Kellum J.A., Levin N. Bouman C., Lameire N. Developing a consensus classification system for acute renal failure // Curr Opin Crit Care.2002. Vol.8.P.509-514.
7. Vivino G., Antonelli M., Moro M. et. al. Risk factors for acute renal failure in trauma patients // Intensive Care Med. 1998. Vol.24. P.808-814.
8. Schiff H., Lang S.M., Fischer R. Daily hemodialysis and the outcome of acute renal failure // N Engl J. Med. 2002. Vol. 346. P.305-310.
9. Bellomo R., Ronco C., Kellum J.A. et al. Acute renal failure-definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conferense of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group // Crit Care.2004. Vol.8.P. R204-R212.
10. Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury // Expert. Opin. Med. Diag. 2008; 2 (4): 387–398.
11. Matthaeus T. et al. Co-regulation of neutrophil gelatinase–associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 in the post ischemic rat kidney // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2001; 12: 787A.
- 12.Amin R. P. et al. Identification of putative gene based markers of renal toxicity // Environ Health Perspect. 2004; 112: 465–479.
13. Mishra J. et al. identification of neutrophil gelatinase–associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2003; 14: 2534–2543.
14. Mishra J. et al. Neutrophil gelatinase–associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2004; 24: 307–315.
15. Mishra J., Dent C., Tarabishi R., Devarajan P. et al. Neutrophil gelatinase–associated lipocalin (NGAL) as biomarker for acute renal injury after cardiac surgery // Lancet. 2005; 365: 1231–1238.
16. Mishra J., Mori K., Devarajan P., Kelly C. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation // Pediatr. Nephrol. 2006; 21: 856–863.
17. Wagener G., Jan M., Kim M., Mori K. et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase–associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery // Anesthesiology. 2006; 105: 485–491.
18. Devarajan, P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney Injury / P. Devarajan // Expert Opin Med Diagn. 2008. № 2(4). P. 387–398.
19. Schrier, R.W. Need to intervene in established acute renal failure / R.W. Schrier // J Am Soc Nephrol. 2004. № 15. P. 2756–2758
20. Kjeldsen L et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. J.Biol.Chem., 1993; 268: 10425-10432.
21. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalanadze A. et.el. Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin J Am Soc Nephrol 18: 407-413, 2007.
22. Mehta R.I., Kellum J.A. Shah S.V. et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury// Crit Care.2007, Vol.11.P. R31.
23. Haase M, Bellomo R, Devarajan P et al., Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injure: A Systematic Review and Meta-analysis Am J Kidney Dis. 2009; 54 (6): 1012024.
24. Warninig W.S., Moonie A. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kiney injury. Clin.Toxicol., 2011, Oct., vol. 49 (8), pp.720-728.