

© Я.Ю.Пролетов, Е.С.Саганова, О.В.Галкина, И.М.Зубина, Е.О.Богданова, В.Г.Сиповский, А.В.Смирнов, 2013
УДК [616.611-002-036.12:616.61-001]-02:575.17

*Я.Ю. Пролетов¹, Е.С. Саганова¹, О.В. Галкина², И.М. Зубина²,
Е.О. Богданова², В.Г. Сиповский², А.В. Смирнов^{1,2}*

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ БИОМАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ ХАРАКТЕРА ХРОНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМИ ГЛОМЕРУЛОПАТИЯМИ

*Ia.Iu. Proletov, E.S. Saganova, O.V. Galkina, I.M. Zubina, E.O. Bogdanova,
V.G. Sipovskii, A.V. Smirnov*

THE ROLE OF SEVERAL BIOMARKERS IN ESTIMATION OF KIDNEY INJURY IN PATIENTS WITH PRIMARY GLOMERULOPATHIES

¹Кафедра пропедевтики внутренних болезней, ²Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного университета им. акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: изучение характера взаимосвязи между биомаркерами и клинико-морфологическими параметрами, отражающими степень гломерулосклероза, тубулоинтерстициального склероза и атрофии канальцев у пациентов с первичной гломерулярной патологией. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** В поперечно-срезовое по дизайну исследование был включен 71 пациент нефрологических отделений, которым выполнялась диагностическая нефробиопсия. По результатам световой, электронной микроскопии, иммунофлюоресцентного исследования у 23 (32,4%) пациентов выявлена IgA-нефropатия (мезангиально-пролиферативный гломерулонефрит), у 14 (19,7%) – фокально-сегментарный гломерулосклероз, у 22 (31,0%) – мембранозная нефropатия, у 12 (16,9%) – болезнь минимальных изменений. Помимо стандартных лабораторных и инструментальных методик, произведена оценка уровня цистатина-С, NGAL в сыворотке крови, цистатина-С, NGAL, нефрина – в суточной моче. Степень выраженности гломерулосклероза, тубулоинтерстициального склероза, атрофии канальцев оценивались количественно и полуколичественно. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Скорость клубочковой фильтрации (СКФ), определенная по цистатину-С сыворотки крови, наиболее точно отражала выраженность гломерулосклероза. NGAL сыворотки крови коррелировал с СКФ по цистатину-С и уровнем нефринурии. Уровень NGAL мочи был связан с выраженностью атрофии канальцев; экскреция NGAL и цистатина-С с мочой достигла максимальных значений у пациентов с высокой протеинурией. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Для оценки выраженности гломерулосклероза у пациентов с первичной гломерулярной патологией предпочтительно использование определение СКФ по цистатину-С. Выраженность атрофии канальцев наиболее точно отражает экскреция NGAL с мочой. NGAL сыворотки характеризует начальные этапы повреждения клеток клубочка. Экскреция NGAL и цистатина-С с мочой зависит от протеинурии, что ограничивает их использование в диагностике острого повреждения почек (ОПП) у пациентов с гломерулярной патологией и высокой протеинурией.

Ключевые слова: биомаркеры, цистатин-С, NGAL, нефрин, гломерулонефрит.

ABSTRACT

THE AIM: assessment of relationship between level of biomarkers and clinical and pathomorphological signs of glomerular, tubular sclerosis and tubular atrophy in patients with primary glomerular disease. **PATIENTS AND METHODS.** In cross-section study 71 patients hospitalized in department of nephrology with performed renal biopsies were included. According the results of light and electron microscopy 23 (32.4%) patients had IgA-nephropathy (mesangial proliferative glomerulonephritis), 14 (19.7%) – focal segmental glomerulosclerosis, 22 (31.0%) – membranous nephropathy, 12 (16.9%) – minimal change disease. Besides standard laboratory and instrumental investigations the level of serum cystatin-C and NGAL, urine cystatin-C, NGAL, nephrin were measured. Glomerulosclerosis, tubulointerstitial sclerosis and tubular atrophy were estimated quantitatively and semi quantitatively. **RESULTS.** GFR estimated using cystatin-C most accurately reflects the degree of glomerular sclerosis. Serum NGAL correlated with GFR estimated using cystatin-C and level of nephrinuria. Urine NGAL and tubular atrophy correlated as well; the rates of urine NGAL and cystatin-C excretion were the highest in patients with high range proteinuria. **CONCLUSION.** The applying of GFR estimated using cystatin-C is preferable in assessment of glomerulosclerosis degree. Urine NGAL excretion most accurately shows the severity of tubular atrophy while serum NGAL reflects the earliest stages of glomerular cell injury. Urine excretion of NGAL and cystatin-C depends on proteinuria and this fact should limit their exploitation in acute kidney injury diagnostics in patients with primary glomerulopathies and high range of proteinuria.

Key words: biomarker, cystatin-C, NGAL, nephrin, glomerulonephritis.

Смирнов А.В. 197089, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, корп. 54, НИИ Нефрологии; E-mail:
smirnov@nephrol.ru

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних лет широко обсуждается возможность диагностики острого повреждения почек (ОПП) и хронической болезни почек (ХБП) с помощью определения концентрации молекул, являющихся «свидетелями» и не всегда участниками патологического процесса, так называемых биомаркеров. Было предложено достаточно большое количество маркеров ОПП [1]. В настоящее время имеется доказательная база, основанная, в том числе, и на мета-анализах [2, 3], подтверждающая целесообразность определения концентрации в крови и моче таких веществ, как цистатин-С, нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (NGAL), связывающий жирные кислоты протеин печеночного типа (L-FABP), молекула почечного повреждения (KIM-1), интерлейкин-18 [4].

Для оценки же течения ХБП в клинической практике на протяжении длительного времени используются такие параметры, как уровень креатинина крови, протеинурия, микроальбуминурия, определение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) различными методами. Однако эти показатели, отражая в определенной степени изменения гломерулярного аппарата, не несут информации о повреждении тубулоинтерстиция, фиброзирование которого, как это было установлено в многочисленных клинко-морфологических исследованиях, определяет прогрессию почечной дисфункции, а следовательно, и прогноз болезни [5–7]. Данное обстоятельство послужило поводом для попытки использовать маркеры повреждения тубулоинтерстиция, уже оправдавшие себя в диагностике ОПП, для оценки характера повреждения почек при хронической почечной патологии [8]. В одной из первых подобных работ была продемонстрирована возможность прогнозирования прогрессии почечной дисфункции на основании измерения базальных значений NGAL в сыворотке крови и моче [9]. В нашем исследовании с целью оценки гломерулярного повреждения определялся уровень цистатина-С сыворотки и нефрина мочи, являющегося структурным компонентом щелевой диафрагмы, наличие которого в моче отражает нарушение структуры подоцита, определяющее развитие склероза клубочков при первичной гломерулярной патологии [10]. В качестве маркеров канальцевого повреждения использовались цистатин-С мочи, характеризующий повреждение проксимальных канальцев, и NGAL сыворотки крови и мочи, отражающий состояние и проксимальных, и дистальных канальцев. Целью работы явилось изучение характера взаимосвязи между биомаркерами и

клинко-морфологическими параметрами, отражающими степень гломерулосклероза, тубулоинтерстициального склероза и атрофии канальцев у пациентов с первичной гломерулярной патологией.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В поперечно-срезовое по дизайну исследование были включены пациенты, госпитализированные в клинику пропедевтики внутренних болезней СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, которым выполнялась диагностическая нефробиопсия, по результатам которой верифицировано наличие первичных гломерулопатий. Исключались пациенты, переносившие острое повреждение почек (в соответствии с критериями AKIN, 2007 г.), больные с онкологической патологией, тяжелыми инфекционными заболеваниями, дисфункцией щитовидной железы, злоупотреблением алкоголем, тяжелой сердечно-сосудистой или дыхательной недостаточностью.

В исследуемую группу вошел 71 пациент, из них мужчин – 39 (54,9%), женщин – 32 (45,1%), средний возраст $42,4 \pm 16,6$ года. В зависимости от морфологического варианта нефропатологии больные распределились по следующим группам: IgA-нефропатия (мезангиально-пролиферативный гломерулонефрит) – 23 человека (32,4%), фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) – 14 (19,7%), мембранозная нефропатия (МН) – 22 (30,1%), болезнь минимальных изменений (БМИ) – 12 (16,9%). У всех пациентов проанализирован клинический вариант течения нефропатии (длительность заболевания, азотемии, наличия артериальной гипертензии и ее степень, длительность и характер мочевого синдрома, объем и эффект проводимой терапии, в том числе патогенетической), выполнены стандартные лабораторные и инструментальные исследования.

Исследование уровня биомаркеров проводилось в суточной моче, собранной за сутки, предшествующие нефробиопсии, сыворотке крови, взятой натощак в день нефробиопсии. Биоматериал собирали согласно стандартной методике, принятой при выполнении лабораторных тестов, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин, после чего проводили исследования, при необходимости материал аликвотировали и хранили при температуре -80°C до момента проведения методики. Во всех образцах сыворотки измеряли концентрации цистатина С (CysC), липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (NGAL), в образцах мочи измеряли концентрации CysC, NGAL, нефрина (Nphrn). Содержание CysC определяли методом иммунотурбидиметрии (наборы фирмы

Таблица 1

Результаты основных клинико-лабораторных параметров

Показатель	1 – БМИ (n=12)	2 – ФСГС (n=14)	3 – МН (n=22)	4 – IgA (n=23)	Вся группа (n=71)	Различие в группах при p<0,05
Пол, М/Ж	6/6	8/6	14/8	12/11	39/32	3/4
Возраст, лет	33,4±17,4	49,8±17,0	50,1±12,2	35,2±14,8	42,4±16,6	1/2 1/3 2/4 3/4
Креатинин сыворотки крови, ммоль/л	0,064 (0,056–0,077)	0,132 (0,097–0,200)	0,097 (0,081–0,110)	0,12 (0,08–0,17)	0,1 (0,074–0,138)	1/2 1/3 1/4 2/3 3/4
Мочевина сыворотки крови, ммоль/л	4,9 (2,8–4,9)	9,1 (5,1–14,5)	5,8 (4,7–7,4)	7,9 (4,3–14,1)	5,9 (4,3–10,8)	1/2 1/3 1/4 2/3
Общий холестерин сыворотки крови, ммоль/л	8,13 (7,09–9,49)	6,4 (5,7–7,0)	7,8±2,5	5,6 (4,0–7,2)	6,7 (5,34–8,31)	1/2 1/4 3/4
Гемоглобин, г/л	138±22	132±26	132±13	130±25	132±22	НД
Общий белок сыворотки крови, г/л	52,0±11,7	56,4±9,3	51±17	62,6±9,7	56,4±11,3	1/4 3/4
Альбумин сыворотки крови, г/л	20,7±9,4	27,8±8,6	23 (11,3–44,0)	34,8±7,1	28,3±8,1	1/2 1/4 2/4 3/4
Клиренс креатинина, мл/мин/1,73 м ²	136,4±48,4	77,6±33,5	103,6±31,15	77,0±44,7	95,3±44,8	1/2 1/3 1/4
СКФ по CKD-EPI, мл/мин/1,73 м ²	112,4±30,7	54,2±30,0	74,6±18,7	61,3±35,0	72,9±34,5	1/2 1/3 1/4 2/3
Суточная потеря белка, г/сут	7,6 (2,8–11,2)	6,2(4,50–6,8)	5,4 (1,9–13,1)	1,4 (1,0–6,2)	4,7 (1,3–9,7)	1/2 1/4 2/4 3/4

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: БМИ – болезнь минимальных изменений, ФСГС – фокально-сегментарный гломерулосклероз, МН – мембранозная нефропатия, IgA – IgA-нефропатия.

«Alfreda Pharma Corporation», Japan) на приборе «Furuno CA-90» («Furuno Electric Co., Ltd.», Japan). Биомаркеры повреждения почек – NGAL (наборы фирмы «BioVendor», «Czech Republic») и Nphrn («Uscn Life Science Inc.», China) – определяли методом иммуноферментного анализа. Оптическую плотность образцов измеряли на полуавтоматическом ридере планшетного типа («ImmunoChem 2100», USA). Исследования проводились на базе НИЛ биохимического гомеостаза организма НИИ Нефрологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. СКФ по цистатину С рассчитывалась при помощи формулы Ноек (2003).

Для патогистологического исследования фрагменты почечной паренхимы фиксировались незамедлительно после получения образцов ткани в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере, pH 7,4, в течение 24 ч при комнатной температуре. После стандартной обработки тканевых фрагментов (обезживание и пропитка) из парафиновых блоков были приготовлены 4–5 мкм серийные срезы. Препараты окрашивались гематоксилином и эозином, реактивом Шиффа (PAS), трихромальной окраской (Masson), по Джонсу, Вейгерту (Veigert), конго красным. Изучение патоморфологических изменений проводилось в светооптическом микроскопе «Carl Zeiss Imager Z 2» (Германия). Патоморфологические изменения оценивались количественно и полуколичественно (0 – нет изменений, 1 – до

25% анализируемых срезов нефробиоптата, 2 – до 50%, 3 – более 50 % анализируемого объекта). Иммунофлюоресцентное исследование (прямая флюоресценция) осуществлялось на криостатных срезах с использованием FITC-меченых антител производство «ДАКО» (Дания). Во всех биопсиях анализировалась депозиция в структурах нефрона IgA, IgM, IgG, C3c, C1q, фибриногена, каппа и лямбда легких цепей. Локализация и интенсивность продукта реакции оценивались полуколичественно по интенсивности свечения флюорохроме (FITC – от 0 до +++). Для ультраструктурного анализа биоптаты почек фиксировались в альдегидном фиксаторе и после стандартной проводки заливались в эпоксидные смолы. Ультратонкие срезы после контрастирования анализировались в трансмиссионном микроскопе «Jeol-7A» (Япония). Исследования проводились на базе НИЛ клинической иммунологии и морфологии НИИ Нефрологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica 6.0 for Windows). Использовались стандартные методы параметрической и непараметрической статистики. Данные в таблицах представлены в виде среднего и стандартного отклонения в случае правильного распределения, медианы и межквартильного размаха – при неправильном.

Таблица 2

Распределение пациентов по стадиям ХБП

Стадия ХБП	1 – БМИ (n=12)	2 – ФСГС (n=14)	3 – МН (n=22)	4 – IgA (n=23)	Вся группа (n=71)
1	9	0	4	2	15
2	1	1	8	3	13
3	1	4	1	2	8
4	0	1	0	0	1
5	0	2	0	2	4

Примечание. При распределении учитывалась СКФ по СКД-EPI.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основные клинико-лабораторные показатели представлены табл. 1.

В группах с МН и ФСГС были пациенты более старшего возраста. Более низкий уровень креатинина и мочевины был зафиксирован в группах с БМИ и МН. Распределение по стадиям ХБП отражено в табл. 2.

Суточная протеинурия была достоверно ниже в группе больных с IgA-нефропатией, чем у пациентов с непролиферативными формами гломерулонефритов (БМИ, МН, ФСГС; $n=48$) ($p=0,006$). По уровню альбумина сыворотки крови наивысшие значения наблюдались у пациентов с IgA-нефропатией по сравнению с остальными группами. Более высокий уровень общего холестерина отмечался в группах пациентов с непролиферативными формами

Из рис. 1 следует, что нормальное распределение наблюдалось в значениях NGAL сыворотки, СКФ по цистатину-С, ненормальное – NGAL, цистатин-С, нефрин мочи, что определяло использование методов параметрической или непараметрической статистики при обработке результатов. В табл. 3 представлены значения биомаркеров.

СКФ, рассчитанная различными методами (клиренс креатинина, СКД-EPI, по цистатину-С) в

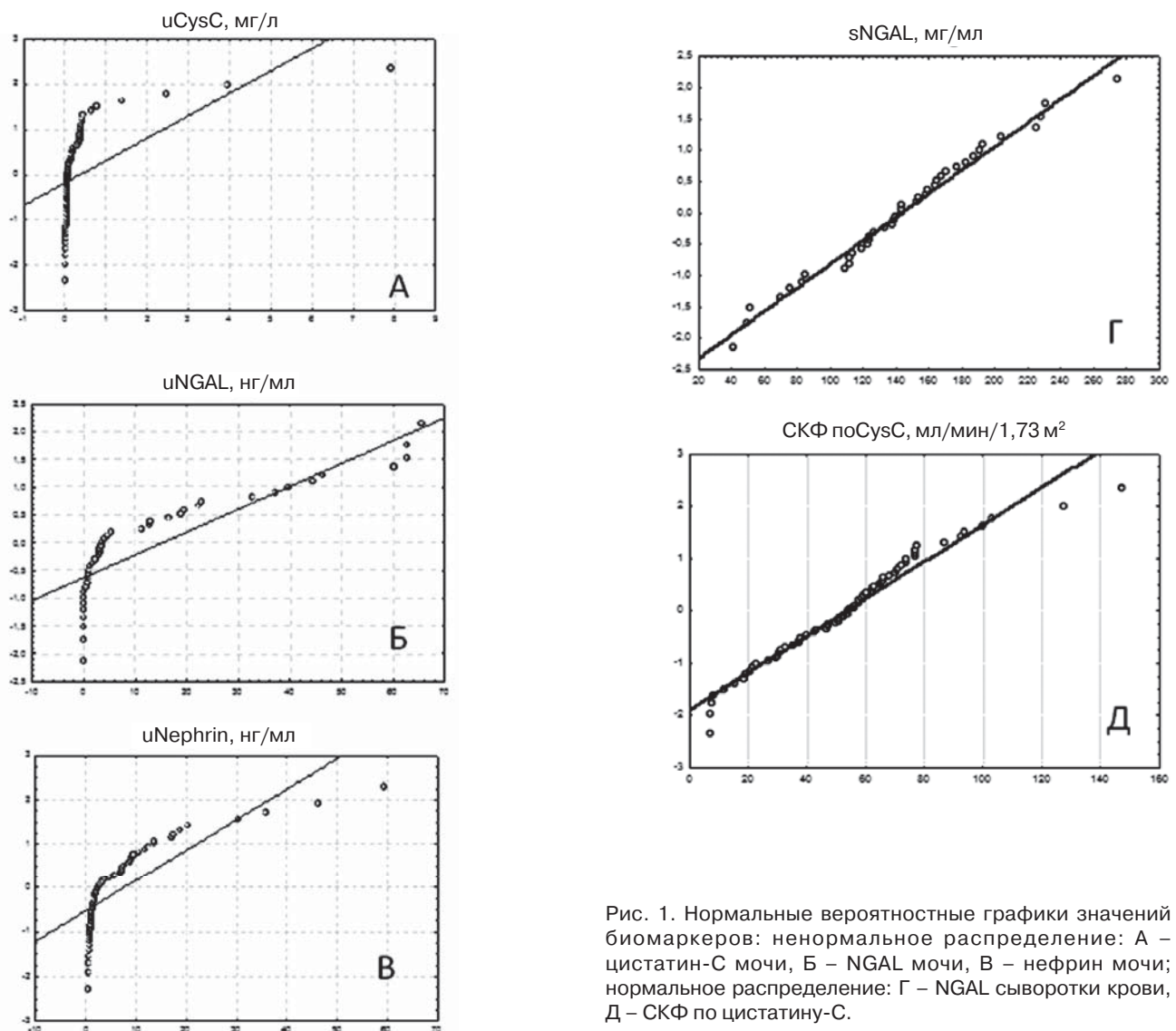


Рис. 1. Нормальные вероятностные графики значений биомаркеров: ненормальное распределение: А – цистатин-С мочи, Б – NGAL мочи, В – нефрин мочи; нормальное распределение: Г – NGAL сыворотки крови, Д – СКФ по цистатину-С.

Таблица 3

Данные по уровням биомаркеров

Показатель	1 – БМИ (n=12)	2 – ФСГС (n=14)	3 – МН (n=22)	4 – IgA (n=23)	Вся группа (n=71)	Различие в группах при p<0,05
СКФ по ЦисС, мл/ мин/1,73 м ²	81,1±32,4	37,5±18,8	55,9±17,4	46,5±26,2	53,6±27,1	1/2 1/3 1/4 2/3
Цистатин-С сыворотки крови, мг/л	1,11 (0,79- 1,27)	1,98 (1,45- 2,96)	1,31 (1,11- 1,56)	1,62 (1,15- 3,07)	1,35 (1,11- 2,04)	1/2 1/3 1/4 2/3
Цистатин-С мочи, мг/л	0,051 (0,028- 0,089)	0,140 (0,055- 0,389)	0,115 (0,050- 0,300)	0,050 (0,050- 0,361)	0,08 (0,05- 0,34)	1/2 1/3
NGAL сыворотки крови, нг/мл	142,9±51,2 n=11	163,6±143,8 n=8	149,4±51,3 n=13	118,0±56,8 n=9	143±51 n=41	НД
NGAL мочи, нг/мл	3,12 (0,03- 5,28) n=11	22,6 (15,35- 53,66) n=8	3,03 (0,05- 12,92) n=13	1,82 (1,03- 39,76) n=9	3,59 (0,98- 22,33) n=41	1/2 2/3
Нефрин мочи, нг/мл	9,88 (4,35- 16,31) n=8	4,80 (1,40- 11,91) n=13	2,43 (1,12- 7,23) n=21	1,67 (0,94- 7,16) n=18	2,58 (1,14- 9,10) n=60	1/2 1/3 1/4

Таблица 4

Результаты морфологического исследования

Показатель	1 – БМИ (n=12)	2 – ФСГС (n=14)	3 – МН (n=22)	4 – IgA (n=23)	Различие в группах при p<0,05
Доля клубочков с глобальным гломерулосклерозом	0	0,14±0,08	0,06±0,07	0,26±0,22	1/2 1/4 2/3 3/4
Доля клубочков с сегментарным склерозом	0	0,15±0,09	0,04±0,06	0,13±0,1	
Суммарная доля клубочков со склерозом	0	0,29±0,11	0,09±0,1	0,39±0,28	
Склероз тубулоинтерстиция ≥10/<10%	0/12	11/3	14/8	16/7	1/2 1/3 1/4
Атрофия канальцев ≥50/<50%	0/12	10/4	3/19	12/11	1/4 3/4

группе БМИ была достоверно выше по сравнению с остальными группами. Также выявлено различие по СКФ по CysC и СКД-EPI между пациентами с МН и ФСГС, что не было отмечено в отношении клиренса креатинина.

Различий NGAL сыворотки (sNGAL) в группах не выявлено. Наивысший уровень NGAL мочи (uNGAL), как и цистатина-С мочи (uCysC), наблюдался у пациентов с ФСГС, тогда как наивысшая нефринургия отмечалась у пациентов с БМИ.

Данные морфологического исследования приведены в табл. 4.

При анализе морфологических изменений в биоптате при световой микроскопии (гломерулярный, тубулоинтерстициальный склероз, атрофия канальцев) в группе БМИ выявлено не было. Выраженность гломерулосклероза была меньше у пациентов с МН при отсутствии достоверных различий между ФСГС и IgA. Атрофия канальцев была меньше у пациентов с МН.

Степень выраженности гломерулосклероза обратно коррелировала с СКФ, оцененной различными методами: по клиренсу креатинина ($r=-0,41$, $p<0,05$), СКФ по СКД-EPI ($r=-0,49$, $p<0,05$), по CysC ($r=-0,56$, $p<0,05$) (рис. 2).

В группе пациентов с IgA-нефропатией степень гломерулосклероза была связана лишь с СКФ, рассчитанной по СКД-EPI ($r=-0,46$, $p<0,05$) и СКФ, измеренной по уровню CysC крови ($r=-0,55$, $p<0,05$), но не с клиренсом креатинина ($p>0,05$). Среди пациентов с МН только СКФ по CysC отражала выраженность гломерулосклероза ($r=-0,42$, $p<0,05$) в отличие от других методов оценки СКФ. Достоверной корреляционной связи между гломерулярным, тубулоинтерстициальным склерозом, атрофией канальцев и экскрецией цистатина-С в суточной моче среди всех групп пациентов не получено ($p>0,05$).

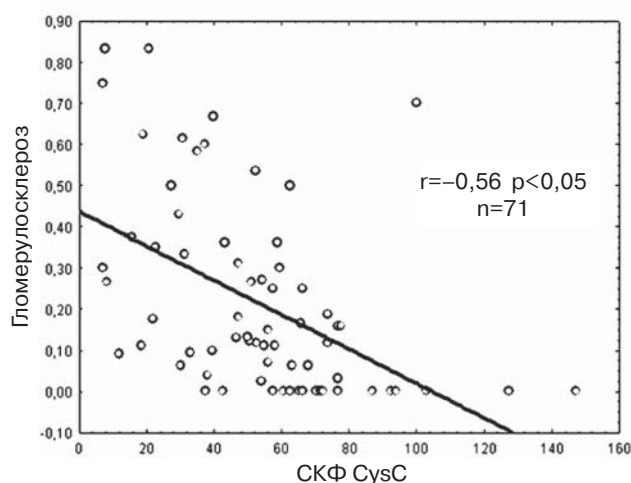


Рис. 2. Корреляция гломерулосклероза с СКФ, определенной по цистатину-С, в общей группе.

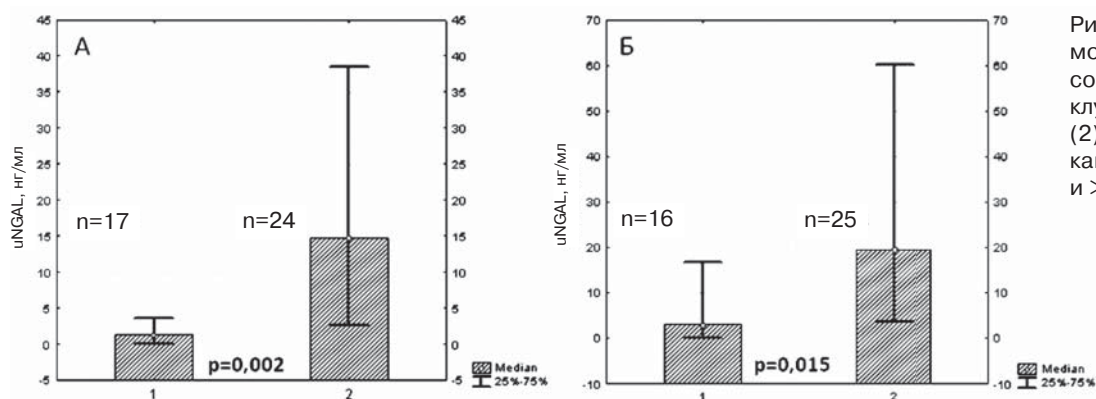


Рис. 3. Уровень NGAL мочи: А – в группах со склерозом <10% клубочков (1) и >10% (2), Б – с атрофией канальцев <50% (1) и >50% (2).

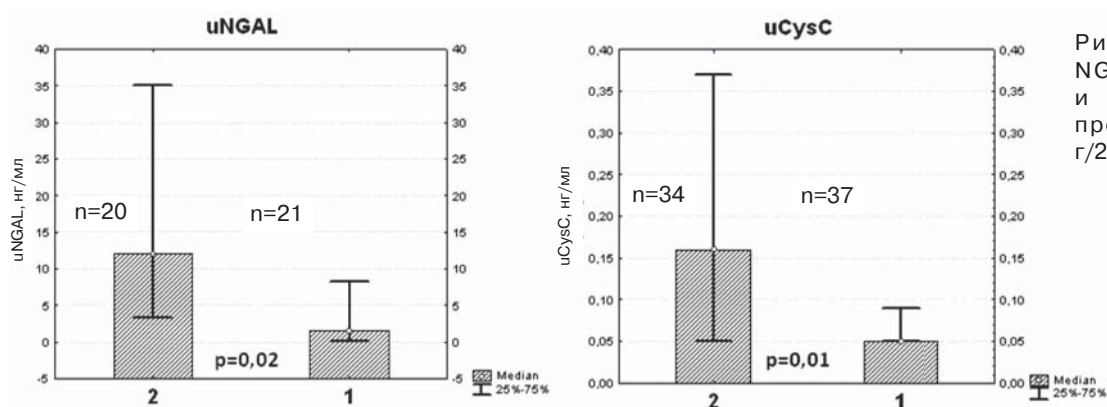


Рис. 4. Уровень NGAL CysC мочи и в группах с протеинурией >5 г/24 (2) <5 г/24 (1).

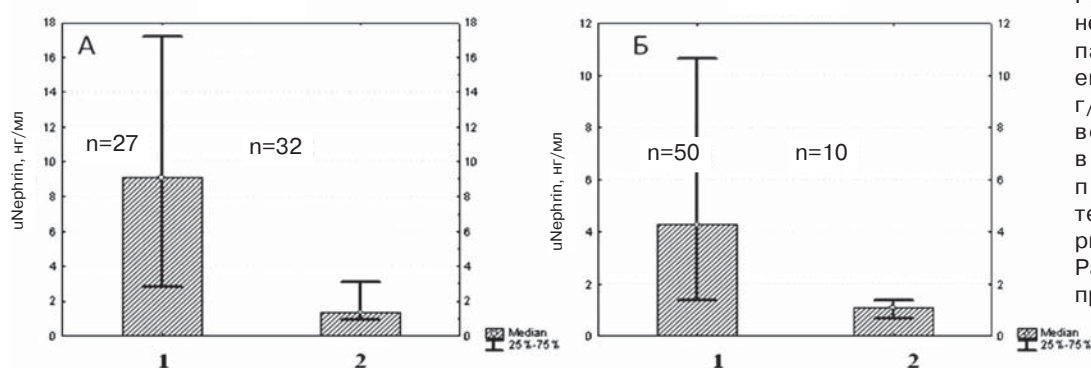


Рис. 5. А – уровень нефринурии в группах с протеинурией >5 г/24 (1) и <5 г/24 (2); Б – уровень нефринурии в зависимости от предшествующей терапии циклоспорином 16±3 мес (2). Различия в группах при $p < 0,001$.

Значения sNGAL и uNGAL между собой не были взаимосвязаны ($r=0,18$). sNGAL коррелировал с СКФ, определенной по CysC ($r=-0,34$, $p<0,05$), но не с СКФ по CKD-EPI и клиренсом креатинина ($r=-0,16$, $r=-0,05$ соответственно). Корреляция sNGAL с морфологическими параметрами (склероз клубочков, атрофия канальцев, тубулоинтерстициальный склероз) отсутствовала. uNGAL был достоверно выше в группе пациентов с более выраженным гломерулосклерозом. Более высокий уровень uNGAL отмечался у пациентов с атрофией канальцев более 50% ($p<0,05$). Данные закономерности подтверждались и при оценке линейной корреляции ($r=0,43$, $r=0,45$ для гломерулярного склероза и атрофии канальцев соответственно при $p<0,05$) (рис. 3).

Наибольшие значения uNGAL и uCysC были в группах больных с суточной протеинурией более 5 г/сут (рис. 4), что соответствует данным, полученным при корреляционном анализе ($r=0,35$, $r=0,33$ соответственно при $p<0,05$). В группе пациентов с IgA-нефропатией достоверной связи между uNGAL, uCysC и уровнем протеинурии получено не было. Также имела обратная взаимосвязь uNGAL и uCysC с СКФ независимо от метода ее определения.

Так, при наличии корреляции между sNGAL и СКФ, определенной по CysC ($r=-0,58$), наблюдалось ее отсутствие с уровнем нефринурии. Также в этой группе СКФ по CysC отчетливо коррелировала с морфологической картиной ($r=-0,55$, $r=-0,57$, $r=-0,78$ с гломерулосклерозом, тубулоинтерстици-

альным склерозом и атрофией канальцев соответственно при $p < 0,05$). СКФ по CKD EPI и клиренс креатинина данные закономерности не отражали. Имелось соотношение sNGAL и CysC мочи (uCysC) с нефринурией ($r=0,37$, $r=0,49$ соответственно при $p < 0,05$). Уровень нефринурии при описанной выше корреляции с уровнем sNGAL в общей группе и группе МН и ФСГС коррелировал с уровнем протеинурии ($r=0,64$ и $r=0,74$ соответственно при $p < 0,05$). Также было выявлено достоверное различие между уровнем нефринурии в группе пациентов с непролиферативными гломерулопатиями, получавшими и не получавшими до этого терапию циклоспорином и глюкокортикоидами (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Традиционные маркеры почечного повреждения, используемые в нефрологии, отражают функциональные изменения, которые являются более поздними по отношению к нарушению структуры различных компартментов нефрона. В свою очередь, биопсия почки, являясь «золотым» стандартом диагностики в нефрологии, остается дорогостоящей инвазивной методикой. Данное обстоятельство предопределило необходимость изучения биомаркеров повреждения почек, обоснованность использования которых уже получила подтверждение в диагностике ОПП [4]. Только в последние годы некоторые из них стали применяться для оценки степени выраженности хронического повреждения и темпов прогрессирования хронической почечной патологии.

В нашей работе были исследованы такие биомаркеры, как цистатин С, NGAL, нефрин. В отличие от других исследований оценивалось содержание не только в утренней порции, но и в суточной моче, а также в сыворотке крови. Из всех биомаркеров со степенью выраженности гломерулосклероза при различных формах гломерулопатий (МН, ФСГС, IgA-нефропатия) более достоверно коррелировала СКФ по цистатину-С, рассчитанная по формуле Ноек.

Полученные данные соотносятся с представлением о том, что использование традиционных методик в оценке СКФ не является вполне точным [11]. Это обусловлено как внепочечными факторами, влияющими на концентрацию креатинина (пол, расовая принадлежность, объем мышечной массы и т.д.), так и особенностями его метаболизма (увеличение секреции креатинина на поздних стадиях ХБП и др.). Даже 50% снижение СКФ нередко ассоциировано с нормальной концентрацией креатинина сыворотки [12–14]. Рядом исследований продемонстрировано, что CysC является более точным

маркером СКФ, чем сывороточный креатинин [15], в особенности при незначительном или умеренном снижении СКФ, у пациентов с сахарным диабетом [16, 17], а также после трансплантации почки [18]. В проспективном исследовании было показано, что прогрессирование почечной дисфункции у пациентов с хроническими гломерулопатиями ассоциировано с исходным высоким уровнем CysC [19]. Таким образом определение СКФ, рассчитанной по цистатину С, может быть использовано с целью оценки прогноза течения гломерулопатий.

При непролиферативных гломерулопатиях основным механизмом повреждения клубочка является нарушение структуры щелевидной диафрагмы и самого подоцита [10], тогда как при пролиферативных гломерулопатиях повреждение подоцита развивается на более поздних этапах патологического процесса [20]. Нефрин, трансмембранный протеин, являясь основным структурным компонентом щелевой диафрагмы, определяет ее структурную целостность, а также тесно взаимодействует с рядом других белков, экспрессирующихся в подоцитах [21, 22]. В экспериментальных исследованиях повреждение и дисрегуляция гена нефрина ассоциировались с развитием альбуминурии и такими морфологическими признаками, как деформация ножковых отростков подоцитов и гломерулосклероз [23, 24]. Публикации о значении определения уровня нефрина в моче в основном касаются исследований, посвященных диабетической нефропатии [25]. В исследовании пациентов с первичными вариантами гломерулярной патологии была выявлена прямая зависимость уровня нефринурии от артериальной гипертензии, длительности нефротического синдрома, вероятности его ремиссии в течение 6 мес в ответ на терапию [26]. Нефринурия отражает активное повреждение подоцитов с деструкцией щелевидной мембраны, при котором выраженных склеротических изменений в клубочке еще не развивается, что объясняет отсутствие соотношения нефринурии и гломерулосклероза в нашей работе. В то же время, была отмечена взаимосвязь уровней sNGAL и нефринурии при отсутствии соотношения sNGAL со склерозом клубочков, тубулоинтерстиция, атрофии канальцев. Еще в 2007 г. была высказана гипотеза о том, что NGAL мочи отражает активное, еще не проявившее себя морфологически, поражение клеток тубулярного эпителия [27]. С учетом особенностей кинетики NGAL, хорошо изученной на примере ОПП [28], вполне оправданным представляется положение о том, что у пациентов с гломерулопатиями sNGAL может отражать активное повреждение клеток

клубочка. Физиологическими функциями NGAL является восстановление поврежденного эпителия, контролируемое ремоделирование соединительной ткани, бактериостатическое действие [29]. Уровень сывороточного NGAL отражает так называемый системный пул, который фильтруется в клубочке с целью защиты проксимальных отделов нефрона, затем обратно реабсорбируясь, обеспечивая таким образом «системную» циркуляцию. Экспрессия в дистальных канальцах обусловлена необходимостью протекции нижних отделов урогенитального тракта от инфекции, которая, как предполагается, может сопутствовать почечному повреждению и составляет так называемый «мочевой пул» (рис. 6).

Соотношение sNGAL с уровнем нефрина в моче может указывать на отражение раннего, «активного» повреждения подоцитов, не являясь маркером склероза. Соответствует этой позиции и наличие взаимосвязи sNGAL с СКФ, определенной только по CysC, которая наиболее точно свидетельствует о клубочковом поражении. В группе пациентов с IgA-нефропатией данная взаимосвязь не прослеживалась, при этом соотношение sNGAL и СКФ по CysC сохранялось. Доказано, что изначально подоциты при IgA-нефропатии остаются незатронутыми, в первую очередь страдают мезангиальные, эндотелиальные клубочки, лишь при длительном, активном течении происходит вовлечение подоцитарного звена, что и обуславливает нарастание протеинурии, вплоть до развития нефротического синдрома [20]. Вполне вероятно, что определение уровня нефринурии у таких больных будет способствовать более раннему назначению терапии, направленной на сохранение их структуры. Ранее считалось, что терапевтический эффект циклоспорина и глюкокортикоидов при гломерулопатиях

с нефротическим синдромом обусловлен их иммуносупрессивным эффектом, лишь в последние годы было доказано, что это действие опосредовано влиянием на цитоскелет подоцитов [22]. Эти данные подтверждаются и в нашем исследовании. Так, в группе пациентов с МН и ФСГС, получавших в течение 16 ± 3 мес терапию циклоспорином и глюкокортикоидами, наблюдался достоверно более низкий уровень нефринурии (см. рис. 5, Б).

Учитывая особенности метаболизма цистатина-С, который свободно фильтруется в клубочке, затем полностью метаболизируется в проксимальных канальцах в процессе реабсорбции и не секретируется [30], определение его содержания в моче может являться ранним маркером для оценки состояния тубулоинтерстиция и функции клеток проксимальных канальцев. По результатам ряда работ продемонстрирована достоверная связь уровня экскреции цистатина-С с мочой и тубулярной дисфункцией у пациентов с повреждением тубулоинтерстиция [31, 32]. Однако в нашем исследовании взаимосвязи экскреции цистатина-С с мочой и морфологическими изменениями (склероз тубулоинтерстиция, атрофия канальцев) получено не было, что может быть объяснено особенностью пациентов, включенных в исследование (больные с первичной гломерулярной патологией), а также наличием высокого уровня протеинурии в исследуемой группе.

Нами обнаружено, что в группе пациентов с непролиферативными гломерулопатиями повышение уровня экскреции цистатина-С с мочой было обусловлено высокой протеинурией. Эти данные соответствуют результатам ряда как клинических, так и экспериментальных работ. Данное обстоятельство, по-видимому, объясняется общностью механизмов реабсорбции клетками

проксимальных канальцев альбумина и большинства низкомолекулярных белков посредством мегалин-кубинин рецептор-опосредованного эндоцитоза [33, 34].

Аналогичная закономерность наблюдалась и в отношении uNGAL. Ранее в некоторых экспериментальных [33] и клинических [35] исследованиях было отмечено, что высокая протеинурия обуславливает повышение экскреции NGAL с мочой. Помимо механизма конкуренции с альбумином

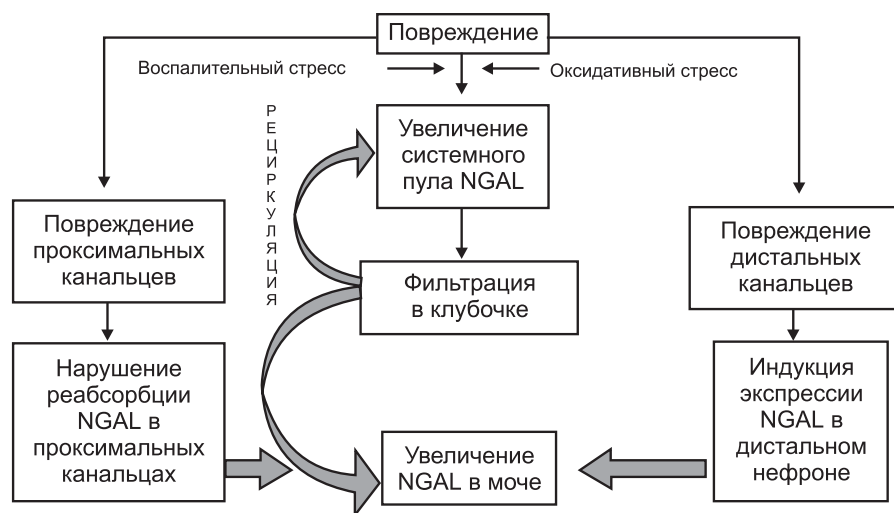


Рис. 6. Клиническая интерпретация увеличения уровней NGAL плазмы и мочи.

при мегалин-кубулин опосредованном эндоцитозе, нельзя исключать вклада повреждения канальцев, которое у данной когорты больных носит вторичный характер по отношению к изменению клубочка. На первый взгляд кажется парадоксальной выявленная при нашем исследовании зависимость уровня uCysC и uNGAL от гломерулосклероза, ведь у нефрологов данные маркеры, прежде всего, ассоциируются с поражением тубулоинтерстиция. Данный факт может быть объяснен особенностью исследуемой группы пациентов с первичным повреждением клубочкового аппарата, при котором изменения канальцев носили вторичный характер. Некоторую ясность может внести и высказанная в отношении NGAL К. Mori и К. Nakao еще в 2007 г. так называемая теория «лесного пожара», в соответствии с которой uNGAL отражает повреждение еще «живых», не погибших клеток тубулярного эпителия [27]. С нашей точки зрения, данное положение может быть применено и в отношении uCysC, что подтверждается наличием достоверной обратной связи между СКФ и уровнем экскреции данных маркеров с мочой, полученной по результатам данного исследования.

Таким образом, диагностическая значимость определения в моче CysC и NGAL в качестве маркеров ОПП при наличии высокой протеинурии является весьма ограниченной, особенно у пациентов с нефротическим синдромом, который может являться непосредственной причиной прerenального ОПП. С нашей точки зрения, у таких пациентов более обоснованным является измерение биомаркеров почечного повреждения в крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для оценки выраженности гломерулосклероза у пациентов с первичной гломерулярной патологией предпочтительно использование определение СКФ по цистатину-С. Выраженность атрофии канальцев наиболее точно отражает экскреция NGAL с мочой. NGAL сыворотки характеризует начальные этапы повреждения клеток клубочка. Экскреция NGAL и цистатина-С с мочой зависит от протеинурии, что ограничивает их использование в диагностике ОПП у пациентов с гломерулярной патологией и высокой протеинурией.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Смирнов АВ, Каюков ИГ, Добронравов АВ, Кучер АГ. Острое повреждение почки и острая почечная недостаточность: некоторые уроки международных инициатив. *Нефрология* 2008; 12 (3): 7-12
2. Haase M, Bellomo R, Devarajan P et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009; 54(6): 1012-1024
3. Zhang Z, Lu B, Sheng X et. al. Cystatin C in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2012; 59(4): 590-2
4. Geus H, Betjes M, Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney Journal* 2012; 5(2): 102-108
5. Ратнер МЯ, Серов ВВ, Томилина НА. Ренальные дисфункции (клинико-морфологическая характеристика). Медицина, М., 1977
6. Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE et al. Structural-functional correlations in renal diseases. Part II: the correlations. *Hum Pathol* 1970; 1(4):631-641
7. Bohle A, Mackensen-Haen S, VonGise et al. The consequences of tubule-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathol Res Pract* 1990; 186(1): 135-144
8. Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC et. al. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney Int* 2011; 80(8): 806-821
9. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G et. al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(2): 337-344
10. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int* 2005; 67 (2): 404-419
11. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150(9): 604-612.
12. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP et. al. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* 1985; 28(5): 830-838.
13. Levey AS, Perrone RD, Madias NE. Serum creatinine and renal function. *Annu Rev Med* 1988; 39: 465-490
14. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992; 38(10): 1933-1953
15. Dharnidharka VR, Kwong C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: A meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2002; 40(2): 221-226
16. Willems D, Wolff F, Mekhali F et al. Cystatin C for early detection of renal impairment in diabetes. *Clin Biochem* 2009; 42(1-2): 108-110
17. Chudleigh RA, Ollerton RL, Dunseath G et al. Use of cystatin C-based estimations of glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52(7): 1274-1278
18. Pöge U, Gerhardt T, Stoffel-Wagner B et al. Cystatin C-based calculation of glomerular filtration rate in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 2006; 70(1): 204-210
19. Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E et al. Serum creatinine, cystatin C, and beta-trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Chem* 2010; 56(5): 740-749
20. Lai KN. Pathogenesis of IgA nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8 (5): 275-283
21. Hothöfer H. Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplan* 2007; 22(8): 2124-2128
22. Смирнов АВ. Лечение гломерулопатий циклоспорином: правильный подход с неверным обоснованием. *Нефрология* 2010; 14 (4): 9-22
23. Rantanen M, Palmen T, Patari A et al. Nephrin TRAP mice lack slit diaphragm and show fibrotic glomeruli and cystic tubular lesions. *J Am Soc Nephro* 2002; 13(6): 1586-1594
24. Forbes JM, Bonnet F, Russo LM et al. Modulation of nephrin in the diabetic kidney: association with systemic hypertension and increasing albuminuria. *J Hypertens* 2002; 20(5): 985-992
25. Pätari A, Forsblom C, Havana M et al. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52(12): 2969-2974
26. Чеботарева НВ, Бобкова ИН, Козловская ЛВ. Нефринурия как показатель структурно-функциональных нарушений

гломерулярного фильтра у больных с протеинурическими формами нефрита. *Клиническая нефрология* 2010; 4: 45-52

27. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney International* 2007; 71(10): 967–970

28. Schmidt-Ott KM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury – where do we stand today? *Nephrol. Dial. Transplant* 2011; 26 (3): 762-764

29. Вельков ВВ. NGAL – «ренальный тропонин», ранний маркер острого повреждения почек: актуальность для нефрологии и кардиохирургии. *Клинико-лабораторный консилиум* 2011; 38(2): 90-100

30. Каюков ИГ, Смирнов АВ, Эмануэль ВЛ. Цистатин С в современной медицине. *Нефрология* 2012; 16 (1): 22-39

31. Conti M, Moutereau S, Zater M et al. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(3): 288–291

32. Herget-Rosenthal S, van Wijk JA, Brouckx M et al.

Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular impairment independent of glomerular filtration rate. *Clin Biochem* 2007; 40 (13-14): 946–951

33. Nejat M, Hill JV, Pickering J et al. Albuminuria increases cystatin C excretion: implications for urinary biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 (5): 1553-1558

34. Thielemans N, Lauwerys R, Bernard A. Competition between albumin and low-molecular-weight proteins for renal tubular uptake in experimental nephropathies. *Nephron* 1994; 66(4): 453–458

35. Bolignano D, Coppolino G, Campo S et. al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23 (1): 414-416

Поступила в редакцию 27.12.2012 г.

Принята в печать 21.01.2013 г.