

© Долінна М.О., 2015

УДК: 616.611-002-018.54-072:577.112

М.О. ДОЛІННА

**ЛІПОКАЛІН, АСОЦІЙОВАНИЙ З ЖЕЛАТИНАЗОЮ НЕЙТРОФІЛІВ (NGAL) СИРОВАТКИ КРОВІ ЯК МАРКЕР ТУБУЛОІНТЕРСТИЦІАЛЬНОГО УРАЖЕННЯ НИРОК У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ**

*M.A. DOLINNAYA*

**SERUM NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL) AS A MARKER OF TUBULOINTERSTITIAL DAMAGE IN PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS**

Запорізький державний медичний університет

*Zaporozhye State Medical University*

**Ключові слова:** гломерулонефрит, тубулоінтерстиціальне ураження, ліпокалін, асоційований з желатиною нейтрофілів (NGAL).

**Keywords:** glomerulonephritis, tubulointerstitial damage, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL).

**Резюме.** *Определение уровня креатинина крови, скорости клубочковой фильтрации и альбуминурии не несет информации о повреждении тубулоинтерстициальной ткани (ТИТ) почек. В связи с этим особую актуальность приобретает поиск неинвазивных методов диагностики, которые позволят на ранних стадиях диагностировать поражение ТИТ почек и начинать адекватное лечение. Данное обстоятельство послужило поводом для попытки использования липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (NGAL) для оценки поражения ТИТ почек при ХГН.*

*Цель исследования: проанализировать морфологическую картину почек у больных ХГН с артериальной гипертензией (АГ) и без, изучить взаимосвязь между NGAL сыворотки крови и гистологическими показателями поражения ТИТ почек у больных ХГН с сохраненной функцией почек.*

*Материалы и методы. Обследован 81 больной ХГН. Пациенты были разделены на 2 клинические группы: больные ХГН с АГ, ХГН без АГ. Анализировались показатели поражения ТИТ почек по данным прижизненного морфологического исследования почек, уровень NGAL сыворотки крови.*

*Результаты. Больные ХГН с АГ имеют более выраженную гистологическую картину по показателям поражения ТИТ почек, чем больные ХГН без АГ. У больных ХГН с АГ уровень NGAL сыворотки крови в 2 раза выше чем в группе контроля, а у пациентов с ХГН без АГ – в 1,2 раза. Обнаружена корреляционная связь между NGAL сыворотки крови и показателями поражения ТИТ почек. Анализ операционных характеристик метода диагностики интерстициального фиброза (ИФ) почек с помощью определения маркера NGAL в сыворотке крови позволяет сделать вывод, что этот метод является высоко чувствительным и специфическим, с эффективностью 95,3%. С помощью построения нелинейной модели обнаружено, что повышение уровня NGAL сыворотки крови выше 5 нг/мл свидетельствует о высокой вероятности наличия ИФ у больных ХГН.*

*Заключение: между NGAL сыворотки крови и показателями поражения ТИТ почек у больных ХГН существует корреляционная связь различной силы, сильная прямая связь выявлена между NGAL крови и ИФ. Диагностика ИФ по уровню NGAL сыворотки крови является высоко чувствительным и специфическим методом, с эффективностью 95,3%. Повышение уровня NGAL сыворотки крови выше 5 нг/мл свидетельствует о высокой вероятности наличия ИФ у больных ХГН.*

**Summary.** *Determining of serum creatinine level, glomerular filtration rate and albuminuria gives us no information about tubulointerstitial kidney damage. So it is especially important to search for non-invasive diagnostic methods that allow to diagnose early stages of tubulointerstitial kidney damage and start adequate treatment. This circumstance attempts to use neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) to assess tubulointerstitial kidney damage in patients with chronic glomerulonephritis (CGN).*

*The aim: to analyze the morphological picture of the kidneys in patients with CGN with arterial hypertension (AH) and without, to investigate the relationship between serum NGAL and histological indexes of tubulointerstitial kidney damage in CGN patients with saved renal function.*

*Materials and methods. We examined 81 patients with CGN. Patients were divided into two clinical groups: CGN patients with AH, CGN without AH. We analyzed indicators of tubulointerstitial kidney damage according to vivo morphological study, level of serum NGAL.*

*Results. Patients with AH have more pronounced histological damage of tubulointerstitial tissue than CGN patients without AH. Serum NGAL levels are higher in CGN patients with AH and without than in the control group. We find a correlation between serum NGAL and indicators of tubulointer-*

**Долінна Марія Олександрівна**  
**mdolinnaya@yandex.ru**

*stitial kidney damage. Analysis of the diagnostic operating characteristics of interstitial fibrosis (IF) by determining of serum NGAL shows that this method is highly sensitive and specific, with an efficiency of 95,3%. Constructing of a non-linear model revealed that increase of serum NGAL level above 5 ng/ml indicates a high probability of the IF in CGN patients.*

*Conclusion: there is a correlation of varying strength between serum NGAL and indexes of tubulointerstitial kidney damage in CGN patients, strong direct relationship is found between serum NGAL and IF. Diagnostics of IF by determining of serum NGAL is a highly sensitive and specific method with the efficiency of 95.3%. Increase of serum NGAL above 5 ng/ml indicates a high probability of the IF in CGN patients.*

**ВСТУП.** Хронічний гломерулонефрит (ХГН) представляє серйозну проблему сучасної медицини у зв'язку з тяжкістю хвороби та поширеністю в Україні [2]. Соціальне значення проблеми ХГН не стільки в поширеності, скільки в захворюваності осіб молодого віку, ранній інвалідизації та смертності хворих.

Прижиттєва нефробиопсія залишається одним з основних діагностичних методів у сучасній нефрології. Гістологічне дослідження нирок дозволяє не тільки визначати характер патологічних змін, але і прогнозувати ефективність проведеної терапії, ризик несприятливого результату, темпи втрати ниркової функції. До недоліків даного дослідження відносяться його інвазивність і виконання тільки в спеціалізованих нефрологічних відділеннях за чіткими показаннями.

На сьогоднішній день в практиці існує певний спектр маркерів ураження нирок. Серед них креатинін крові, визначення швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) та альбумінурія. Ці показники, відображаючи в цілому зміни гломерулярного апарату, не несуть інформації про пошкодження тубулоінтерстиціальної тканини нирок (ТІТ) нирок, яка відіграє важливу роль у розвитку стійких порушень функції нирок [3]. Відомо, що зниження рівня ШКФ корелює переважно зі ступенем тубулоінтерстиціальних, а не клубочкових ушкоджень, і більшість патологічних змін, які визначають результат захворювань нирок, відбуваються саме в нирковому інтерстиції [4].

У зв'язку з цим особливої актуальності набуває пошук нових неінвазивних методів діагностики, які дозволять на ранніх стадіях діагностувати ураження ТІТ нирок і починати адекватне лікування.

Дана обставина послужила приводом для спроби використання ліпокаліна, асоційованого з желатиназою нейтрофілів (NGAL), який вже виправдав себе в діагностиці гострого пошкодження нирок, для оцінки ураження ТІТ нирок при ХГН [5,6].

Сучасні стратегії нефропротекції у пацієнтів з ХГН можуть бути переосмислені шляхом спрямування на рівні біологічних маркерів, які вказують на ступень ураження ТІТ нирок. Тому виявлення нових мішеней відкриває перспективні обрії у діагностиці та лікуванні хворих на ХГН.

**МЕТА:** проаналізувати морфологічну картину нирок у хворих на ХГН з АГ і без і вивчити взаємозв'язок між NGAL сироватки крові та гістологічними показниками тубулоінтерстиціального ураження нирок у хворих на ХГН зі збереженою функцією нирок.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** На базі нефрологічного відділення Запорізької обласної клінічної лікарні обстежено 81 хворий на ХГН. Діагноз «хронічний гломерулонефрит» був верифікований на підставі клінічних, лабораторних даних і прижиттєвого морфологічного дослідження нирок (ПМДН).

Пацієнти були розділені на 2 клінічні групи: хворі на ХГН з артеріальною гіпертензією (АГ), ХГН без АГ. До першої групи увійшло 49 хворих ХГН з АГ (чоловіки склали 69%, жінки – 31%), які мали середній вік  $36,3 \pm 11,3$  років, тривалість захворювання  $87,1 \pm 85,8$  місяців та АГ 26 (12:72) місяців. Нефротичний синдром з рівнем протеїнурії (ПУ) вище 3 г/л спостерігався у 8% пацієнтів. Сечовий синдром у вигляді низької ПУ та різного ступеня вираженості еритроцитурії був виявлений у 86% хворих, ПУ вище 1 г/л – у 6%. Середній рівень добової ПУ склав 0,5 (0,1:1,2) г/доб. Друга клінічна група – це 32 хворих на ХГН без АГ. Чоловіки склали 62,5% групи, жінки – 37,5%, середній вік  $28,7 \pm 10,5$  років, тривалість захворювання 48 (24:72) місяців. Сечовий синдром проявлявся низькою ПУ та різного ступеня вираженості еритроцитурією. Середній рівень добової ПУ склав 0,07(0:0,3) г/доб. У 66% пацієнтів лабораторна картина трактувалась як ремісія. Контрольну групу становили 20 практично здорових осіб, які були обстежені для уточнення нормативів рівнів маркеру.

Результати основних клініко-лабораторних параметрів пацієнтів досліджуваних груп представлено в табл. 1.

Таблиця 1

#### Основні клініко-лабораторні параметри хворих ХГН

Показник	Хворі на ХГН з АГ (n=49)	Хворі на ХГН без АГ (n=32)
	1	2
Гемоглобін, г/л	134,5±16,8	138,5±19,3
Альбумін крові, г/л	39,8±7,2	44,1±5,9
Холестерин крові, ммоль/л	5,9±2,1	4,9±1,3
Креатинін крові, мкмоль/л	101,9±26,4	97,2±35,3
Мочевина крові, ммоль/л	6,0±2,0	5,9±3,3
ШКФ (MDRD), мл/хв/1,73 м <sup>2</sup>	80,0±27,0	87,5±21,9
ШКФ (Cockcroft-Gault), мл/хв/1,73 м <sup>2</sup>	91,7±29,3	94,5±21,8

Статистично значущих відмінностей ( $p_{1,2} < 0,001$ ) за показниками: рівень гемоглобіну, альбуміну, холестерину, мочевины крові, ШКФ (MDRD, Cockcroft-Gault) між групами хворих на ХГН з АГ і без не виявлено. Досліджувані клінічні групи порівняні між собою за вихідними характеристиками, мають нормальний розподіл і відповідають вимогам репрезентативної вибірки.

Для аналізу ураження ТІТ нирок у хворих на ХГН використовувалися дані ПМДН. Патогістологічне дослідження біоптату нирки проводилося в лабораторії патогістологічної і імуногістохімічної діагностики УНМЦ «Університетська клініка» Запорізького державного медичного університету.

Аналіз пошкодження ТІТ нирок проводився за такими параметрами: дистрофія та некротичні зміни епітелію каналців, потовщення та/або розщеплення тубулярної базальної мембрани, наявність клітинних інфільтратів, інтерстиціальний фіброз (ІФ) [1,7].

Рівень NGAL сироватки крові визначали імуноферментним методом за допомогою наборів BioVendor (Чехія) на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Запорізького державного медичного університету. Сироватку відокремлювали методом центрифугування негайно та заморожували при температурі  $-700\text{C}$  до моменту проведення методики.

Оцінювалась точність діагностики морфологічних змін нирок за рівнем NGAL сироватки крові у порівнянні з ПМДН за допомогою розрахунку операційних характеристик тесту, до яких відносять: діагностичну чутливість, діагностичну специфічність та діагностичну ефективність. Операційні характеристики тесту визначаються за умов:

- в групах хворих проводилась діагностика двома методами, один з яких є стандартом (його результати вважаються найточнішими), а інший метод, той який перевіряється на точність;
- обидва методи діагностики використовуються незалежно, тобто результати одного методу є відомими при проведенні другого методу;
- кожен з методів дає позитивні або негативні результати.

Діагностична чутливість (ДЧ, Se) показує частку осіб з позитивним результатом тесту серед осіб з діагнозом, який досліджується. Показник розраховується за формулою:

$$Se = (TP/TP + FN) * 100\%, \quad (1.1)$$

де TP – кількість істинно-позитивних результатів,  
FN – кількість хибно-негативних результатів.

Діагностична специфічність (ДС, Sp) показує частку осіб з негативним результатом тесту серед осіб, що не мають досліджуваного діагнозу. Показник розраховується за формулою:

$$Sp = (TN/TN + FP) * 100\%, \quad (1.2)$$

де TN – кількість істинно-негативних результатів,  
FP – кількість хибно-позитивних результатів

Діагностична ефективність (ДЕ) визначається, як середнє арифметичне діагностичної чутливості та діагностичної специфічності за формулою:

$$DE = (ДЧ + ДС)/2. \quad (1.3)$$

Отримані дані дослідження статистично оброблені. Використовувалися параметричні (t-тест для вибірок з незв'язаними варіантами) та непараметричні (метод Манна-Уїтні) методи, застосовувався тест хі-квадрат ( $\chi^2$ ) Пірсона; кореляційний аналіз; рангова кореляція Спірмена. Різниця вважалася достовірною при досягнутому рівні значущості  $p < 0,05$ . Дані представлені у вигляді середньої арифметичної (M)  $\pm$  стандартне відхилення (SD) або медіани (25:75 перцентиль). Регресійний аналіз (побудова нелінійних моделей). Отримані в результаті досліджень цифрові дані оброблялися на персональному комп'ютері за допомогою прикладних комп'ютерних програм: Microsoft Excel 2007, Statistica 7.0 та стандартної версії SPSS 16.0 (США).

**РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.** При морфологічному дослідженні у 88% випадків було діагностовано мезангіопроліферативний гломеруло-нефрит, у 7% – мембранозний, 5% – мембрано-проліферативний.

Морфологічна картина групи хворих на ХГН з АГ характеризувалася наявністю дистрофічних змін епітелію каналців різного ступеня вираженості (98%), некротичних змін епітелію каналців (31%), потовщення та/або розщеплення тубулярної базальної мембрани (61%), клітинних інфільтратів (14%), ІФ (100%).

Біоптати нирок пацієнтів з ХГН без АГ мали такі особливості: 31% склали дистрофічні зміни епітелію каналців, некроз епітелію каналців зустрічався у 9% випадків, потовщення та/або розщеплення тубулярної базальної мембрани – 28%, клітинні інфільтрати – 9%, наявність ІФ підтверджена у 13% пацієнтів.

Статистичний аналіз результатів морфологічного дослідження за двома групами показав, що хворі на ХГН з АГ мають виразнішу гістологічну картину за показниками ураження ТІТ нирок, ніж хворі на ХГН без АГ (табл. 2).

Нами досліджено рівні NGAL сироватки крові у хворих на ХГН і групи контролю. Результати представлено в табл. 3.

Середні значення біомаркера в групах дослідження вищі ніж в групі контролю. Так, у хворих на ХГН з АГ рівень NGAL сироватки крові у 2 рази вище ніж в групі контролю, а у пацієнтів з ХГН без АГ – у 1,2 рази. Значення NGAL сироватки крові в групі ХГН з АГ перевищує норму у 89,8% пацієнтів, а у хворих ХГН без АГ – вище за норму у 12,5% випадків ( $p < 0,001$ ).

Таблиця 2

**Показники ураження тубулоінтерстиціальної тканини нирок за даними прижиттєвого морфологічного дослідження у хворих ХГН**

Показник	Результати статистичного аналізу	Інтерпретація результату
Дистрофічні зміни епітелію каналців	$\chi^2=42,9$ , $p<0,05$	У хворих ХГН з АГ виразніші
Некротичні зміни епітелію каналців	$\chi^2=5,1$ , $p<0,05$	У хворих ХГН з АГ виразніші
Потовщення та/або розщеплення тубулярної базальної мембрани	$\chi^2=8,5$ , $p<0,05$	У хворих ХГН з АГ виразніше
Наявність клітинних інфільтратів	$\chi=0,43$ , $p<0,05$	Статистично значущих відмінностей не встановлено
Інтерстиціальний фіброз	$\chi^2=66,8$ , $p<0,05$	У хворих ХГН з АГ виразніший

Таблиця 3

**Середні рівні NGAL сироватки крові у групах хворих на ХГН і контролю**

Показник	Хворі на ХГН з АГ (n=49)	Хворі на ХГН без АГ (n=32)	Група контролю (n=20)
	1	2	3
NGAL сироватки крові, нг/мл	6,8±2,2	4,1±1,5	3,4±1,1

Ми розглядали, що NGAL сироватки крові є показником ураження ТІТ нирок, тому провели кореляційний аналіз між NGAL крові та показниками ТІТ нирок в групі хворих на ХГН, результати якого представлено в табл. 4.

Таблиця 4

**Результати кореляційного аналізу між NGAL сироватки крові та показниками ураження тубулоінтерстиціальної тканини нирок в групі хворих ХГН**

Показник ураження тубулоінтерстиціальної тканини нирок	NGAL сироватки крові
Наявність клітинних інфільтратів	0,151554
Некротичні зміни епітелію каналців	0,27091
Дистрофічні зміни епітелію каналців	0,346893
Потовщення та/або розщепленням тубулярної базальної мембрани	0,42304
Інтерстиціальний фіброз	0,649137

Нами встановлено, що в групах хворих ХГН існує слабкий прямий зв'язок між показником NGAL сироватки крові та некротичними змінами епітелію каналців ( $r=0,271$ ,  $p<0,05$ ), прямий зв'язок середньої сили – між NGAL сироватки крові та дистрофічними змінами епітелію каналців ( $r=0,347$ ,  $p<0,05$ ), потовщенням та/або розщепленням тубулярної базальної мембрани ( $r=0,423$ ,  $p<0,05$ ). Статистично достовірно підтверджений прямий помітний зв'язок між NGAL сироватки крові та ІФ ( $r=0,649$ ).

Враховуючи результати, ми вирішили оцінити точність виявлення ІФ нирок за рівнем біомаркера NGAL сироватки крові за допомогою аналізу операційних характеристик тесту. Діагностика ІФ здійснювалася двома методами: перший метод – ПМДН, другий – за допомогою маркера NGAL сироватки крові. Результати представлено в табл. 5.

Таблиця 5

**Результати діагностики інтерстиціального фіброзу нирок методом біопсії нирки та визначення маркера NGAL сироватки крові**

Метод	Метод біопсія нирки		
	Діагноз	ІФ нирок	Відсутність ІФ нирок
Маркер NGAL сироватки крові	ІФ нирок	48	0
	Відсутність ІФ нирок	5	28

Встановлено, що ДЧ методу складає 90,6%, ДС – 100%, ДЕ – 95,3%.

Аналіз операційних характеристик методу діагностики ІФ нирок за допомогою визначення маркера NGAL у сироватці крові дозволяє зробити висновок, що цей метод є високо чутливим та специфічним, з ефективністю 95,3%.

Нелінійна модель залежності виявлення ІФ нирок за допомогою визначення маркера NGAL сироватки крові у хворих на ХГН має вид:

$$F_i = \frac{1}{1+250 \cdot 0,1^{NGAL_i}}, \quad (1.4)$$

де  $F_i$  – наявність інтерстиціального фіброзу у  $i$ -того хворого;  $NGAL_i$  – рівень NGAL сироватки крові у  $i$ -того хворого.

Якість моделі висока, оскільки коефіцієнт кореляції між значеннями вхідного ряду та модельними значеннями дорівнює 0,967 та наближається до одиниці. Фактичні та модельні значення наявності ІФ в залежності від рівня NGAL сироватки крові у хворих на ХГН представлено на рис. 1.

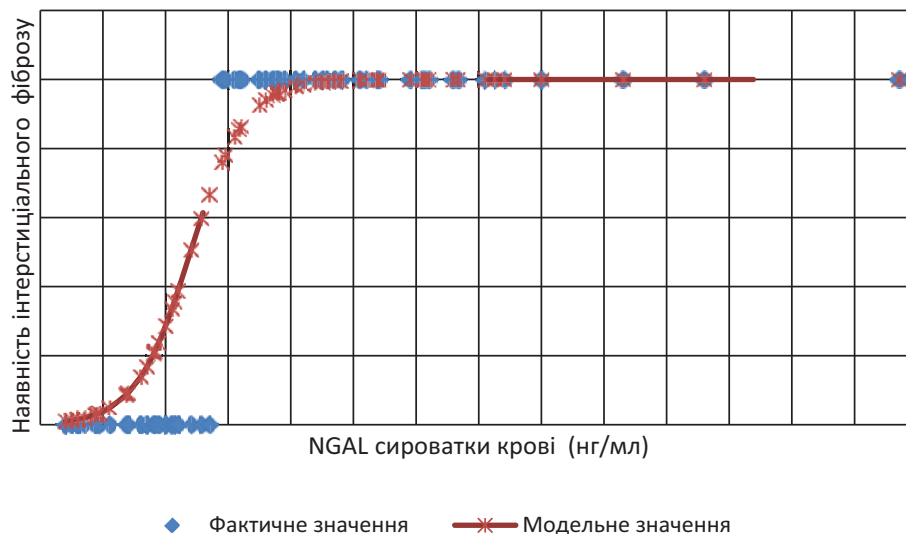


Рис. 1. Фактичні та модельні значення наявності ІФ в залежності від рівня NGAL сироватки крові у хворих на ХГН.

Отже, аналіз побудованої моделі дозволяє зробити висновок, що підвищення рівня NGAL сироватки крові вище 5 нг/мл свідчить про високу ймовірність наявності ІФ у хворих на ХГН.

#### ВИСНОВКИ:

1. Хворі на ХГН з АГ мають виразнішу гістологічну картину за показниками тубулоінтерстиціального ураження, ніж пацієнти з ХГН без АГ.
2. Між NGAL сироватки крові та показниками ураження тубулоінтерстиціальної тканини нирок у хворих ХГН існує кореляційний зв'язок різної сили, сильний прямий зв'язок виявлено між NGAL крові та інтерстиціальним фіброзом.
3. За допомогою операційних характеристик тесту продемонстровано, що діагностика інтерстиціального фіброзу за рівнем NGAL сироватки крові є високо чутливим і специфічним методом, з ефективністю 95,3%.
4. Підвищення рівня NGAL сироватки крові вище 5 нг/мл свідчить про високу ймовірність наявності інтерстиціального фіброзу у хворих на ХГН.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Клініко-морфологічні кореляції при первинних проліферативних гломерулонефрита / О. О. Дядик, Н. Ф. Ярова, М. Д. Іванова, Л. І. Ткаченко // Нирки.— 2012. — № 1. — С. 6–18.

2. Медико-профілактична допомога хворим нефрологічного профілю в Україні / М. О. Колесник, Н. О. Сайдакова, Н. І. Козлюк [та ін.] // Укр. журн. нефрології і діалізу. — 2011. — № 4 (32). — С. 3–11.
3. Арутюнов Г.П. Тубулоінтерстиціальний апарат почки и его поражение при артериальной гипертензии / Г.П. Арутюнов, Л.Г. Оганезова // Клинич. нефрология. — 2011. — №1. — С. 52-57.
4. Арутюнов Г.П. Экспериментальные модели поражения тубулоинтерстициальной ткани почек при артериальной гипертензии / Г.П. Арутюнов, А.В. Соколова, Л.Г. Оганезова // Клинич. нефрология. — 2011. — №2. — С. 75-78.
5. Роль некоторых биомаркеров в оценке характера хронического повреждения почек у пациентов с первичными гломерулопатиями / Я. Ю. Пролетов, Е. С. Саганова, О. В. Галкина [и др.] // Нефрология. — 2013. — Т. 17, № 1. — С. 60–69.
6. Biomarkers in chronic kidney disease : a review / R. G. Fasset, K. S. Venuthurupalli, C. G. Glenda [et al.] // Kidney Int. — 2011. — Vol. 80. — P. 806–821.
7. Coppo R. The new oxford clinic-pathological classification of IgA nephropathy / R. Coppo, D. Cattarun // Sec. Biol. Med. Sci. — 2010. — MASA, XXXI, № 1. — P. 241–248.

Надійшла до редакції 11.03.2015

Прийнята до друку 12.08.2015