



NGAL

**NGAL - МАРКЕР СУБКЛИНИЧЕСКОГО
И ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК:
ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ НЕФРОЛОГИИ
И КАРДИОХИРУРГИИ**

Вельков В В, ЗАО «ДИАКОН», 2011



**Neutrophil gelatinase-associated
lipocalin —
an emerging *troponin*
for kidney injury**

Prasad Devarajan

Division of Nephrology and Hypertension,
Cincinnati Children's Hospital Medical Center,
University of Cincinnati College of Medicine,
Cincinnati, OH 45229-3039, USA

• *Nephrol Dial Transplant* 2008, 23(2) 3737-3743

Острое Повреждение Почек

Acute Kidney Injury

Развивается:

- у 5% всех госпитализированных пациентов,
- у 14,5% критических педиатрических больных,
- у 30% пациентов отделений интенсивной терапии (ОИТ)
- у 50% пациентов, находившихся в ОИТ на диализе — летальный исход из-за ОПП,
- у 25% пациентов, выживших после диализа, в течение 3-х лет развиваются терминальные стадии ренальных заболеваний,

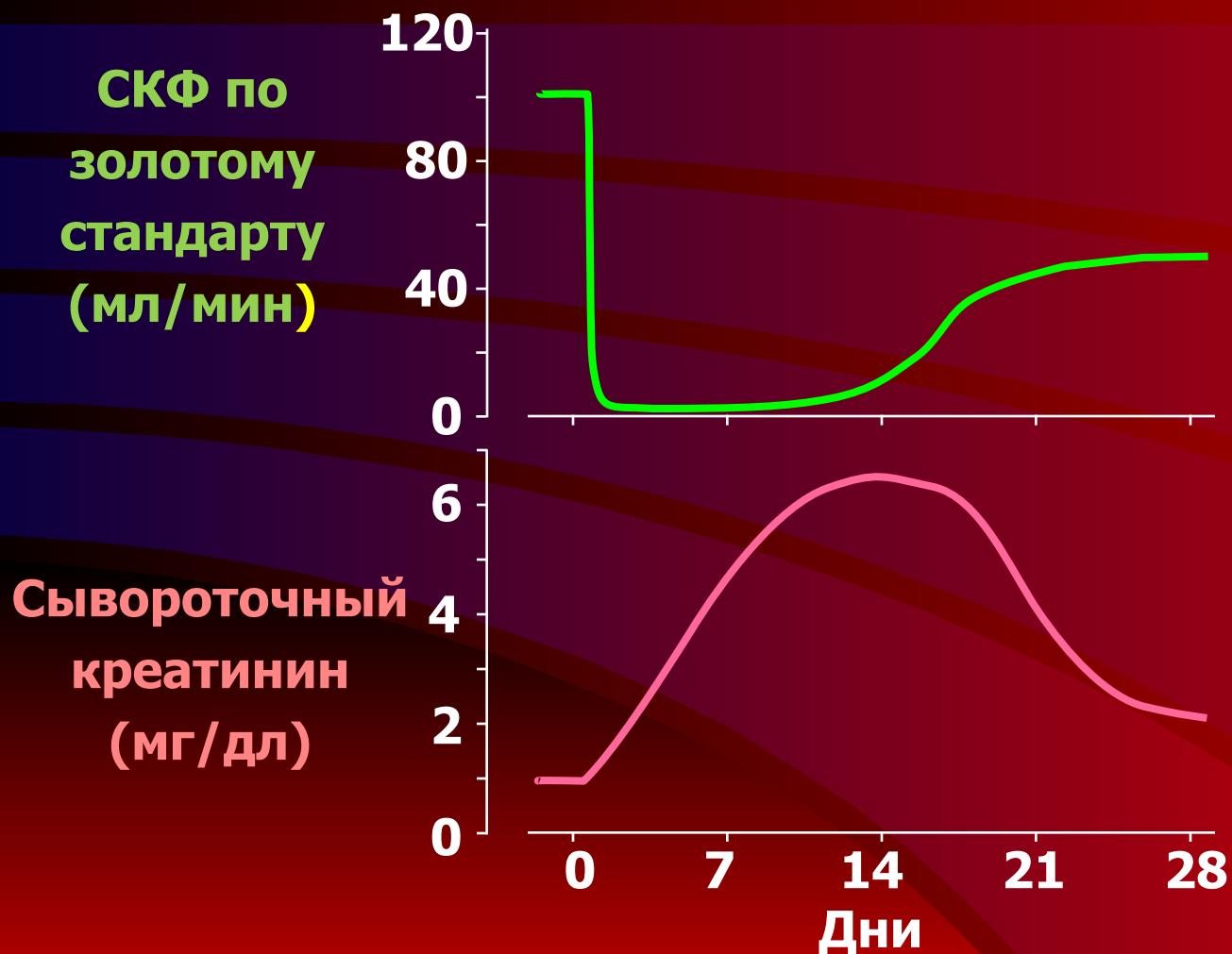
ОПП - причина ~ 4 млн. смертей каждый год

“Utilizing serum creatinine measurements to institute promising interventions for AKI in humans is futile, and analogous to waiting 2 – 3 days before intervening in patients with ischemic acute myocardial infarction or acute neurologic stroke.”... the diagnosis, treatment, and prognosis of AKI have not changed appreciably in the last five decades.”

« Измерение сывороточного креатинина для выработки надежного терапевтического вмешательства при ОПП бесполезно и аналогично ожиданию 2-3 дней перед началом терапии пациентов с ишемическим инсультом, инфарктом миокарда и острым неврологическим инсультом»

“... диагностика, терапия и прогнозирование последствий ОПП не изменялись за последние 50 лет».”

Креатинин «видит» ОПП, «когда уже поздно»



Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)

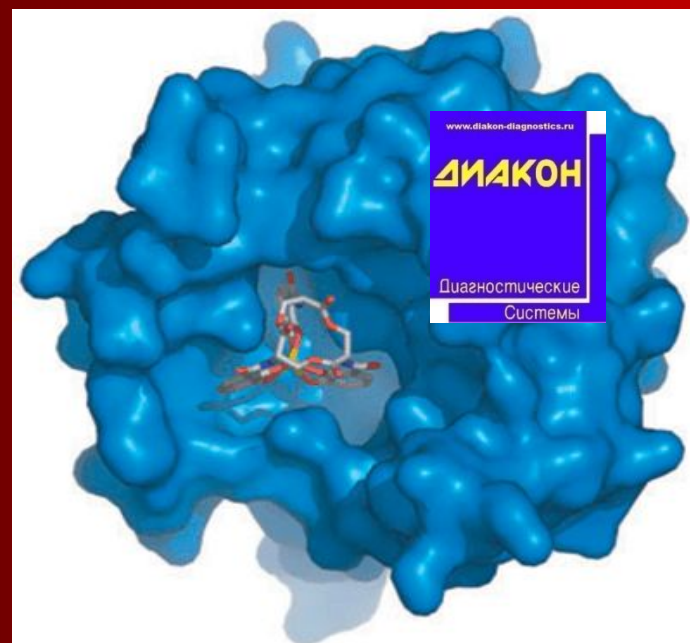
Липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов

Белок, 25 кД, он же: липокалин-2, липокалин нейтрофилов человека, сидерокалин, (HNL - Human neutrophil lipocalin, lipocalin-2, siderocalin)
- связан с желатиназой нейтрофилов и с железом

«NGAL - белок острой фазы»

- **Опыты на животных показали: NGAL один из самых ранних белков, индуцируемых в почках при ишемическом или нефротоксическом стрессе**
- **Многочисленные исследования: u-NGAL - ранний маркер ОПП разных этиологий**
Участвует в защите от бактериальных инфекций, за счет связывания с микробными сидерофорами

Honore, et al. Intensive Care Med 2007
Devarajan, Expert Opin Med Diag 2008
Waikar, et al. Clin J Am Soc Nephrol 2008



- **Структура NGAL,**
- **связанного с Fe(III),**
- Fishbach et al. Nat Chem Biol 2008

Где и когда синтезируется NGAL

- В зависимости от различных патологических состояний NGAL экспрессируется и секретируется большим количеством различных клеток, находящихся в состоянии стресса:
- иммунными клетками, гепатоцитами, адипоцитами, клетками предстательной железы, клетками почечных канальцев и др.

Основные функции NGAL

- NGAL «нормализует» поврежденные ткани за счет:
 - участия в процессе апоптоза,
 - повышения выживаемости поврежденных клеточных структур,
 - восстановления поврежденного эпителия,
 - **стимулирования дифференцировки и структурной реорганизации ренальных эпителиальных клеток.**
- При патологиях может стимулировать:
 - злокачественный рост,
 - ремоделирование атеросклеротических бляшек,
- ремоделирование миоцитов при ишемических повреждениях миокарда.

NGAL как бактериостатик

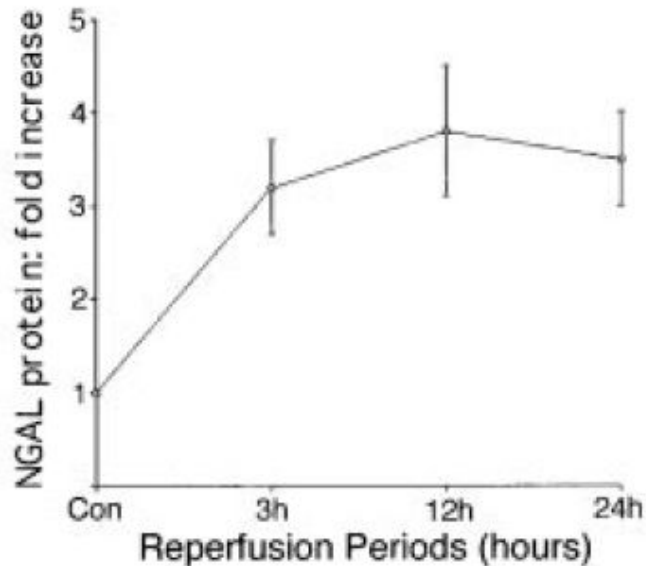
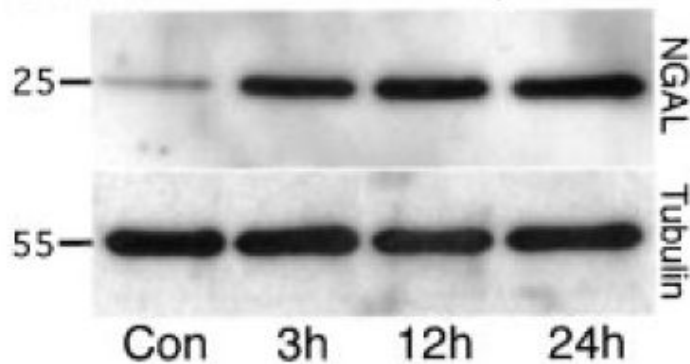
- **Образует комплексы с микробными сидерофорами, связывает железо, необходимое микробам и, тем самым, тормозит их рост.**
- **Сидерофоры – железо переносящие белки животных и бактерий**

Индукция синтеза белка NGAL в почках мыши после унилатеральной и билатеральной ишемии

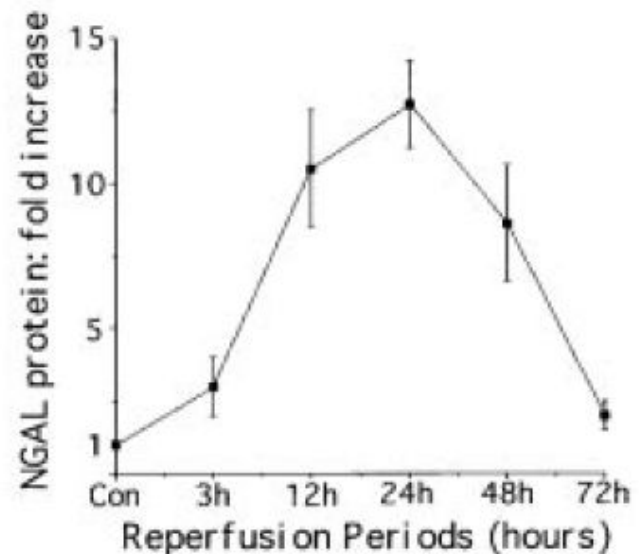
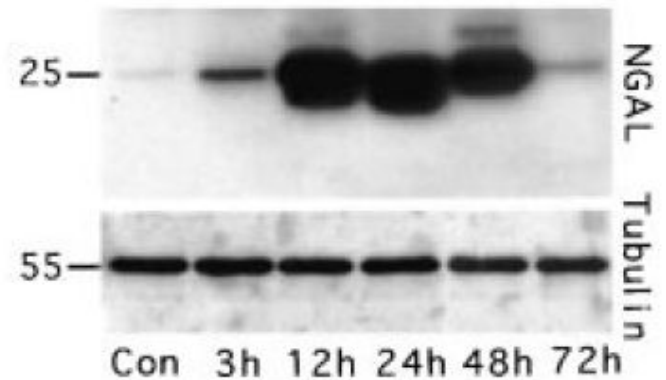
(unilateral or bilateral ischaemia)

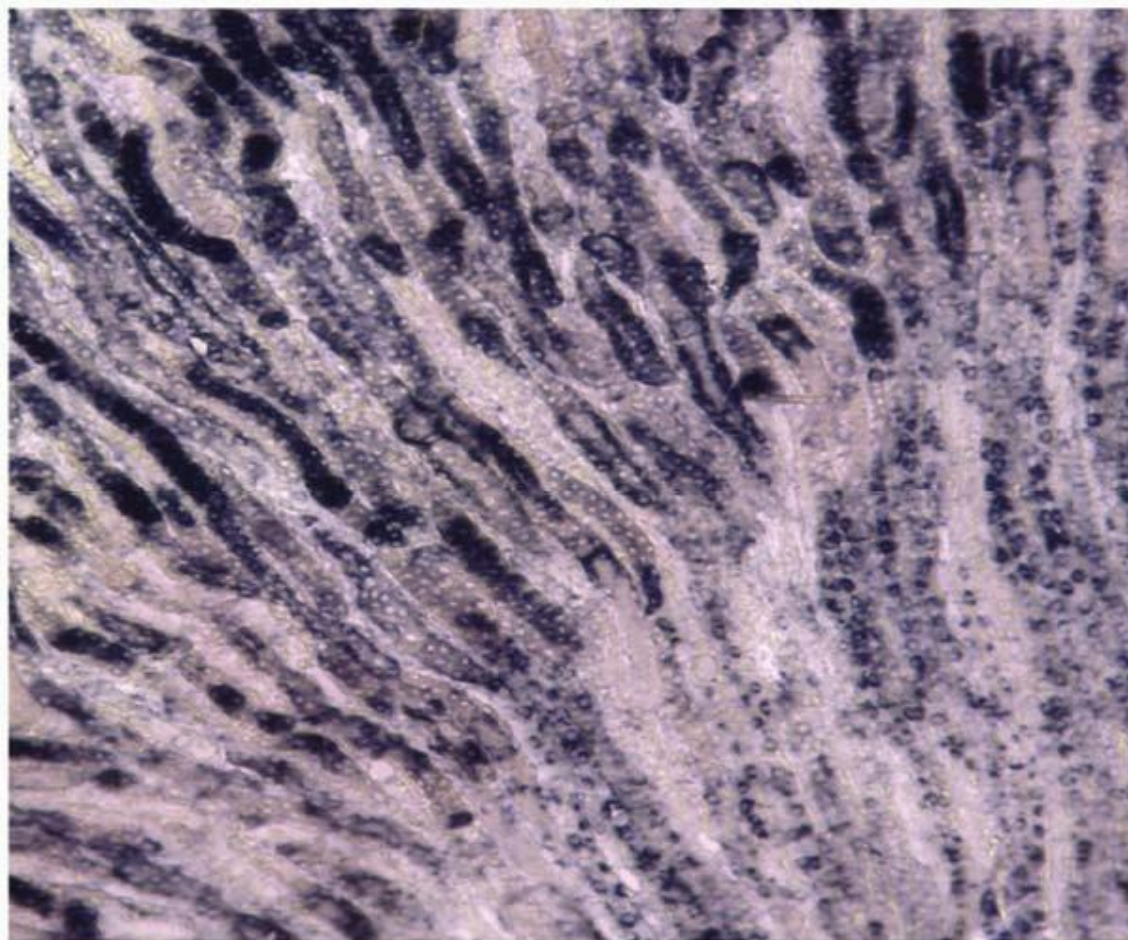
(Mishra J et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. J Am Soc Nephrol 2003;14:2534-2543)

Unilateral Ischemia-Reperfusion



Bilateral Ischemia-Reperfusion





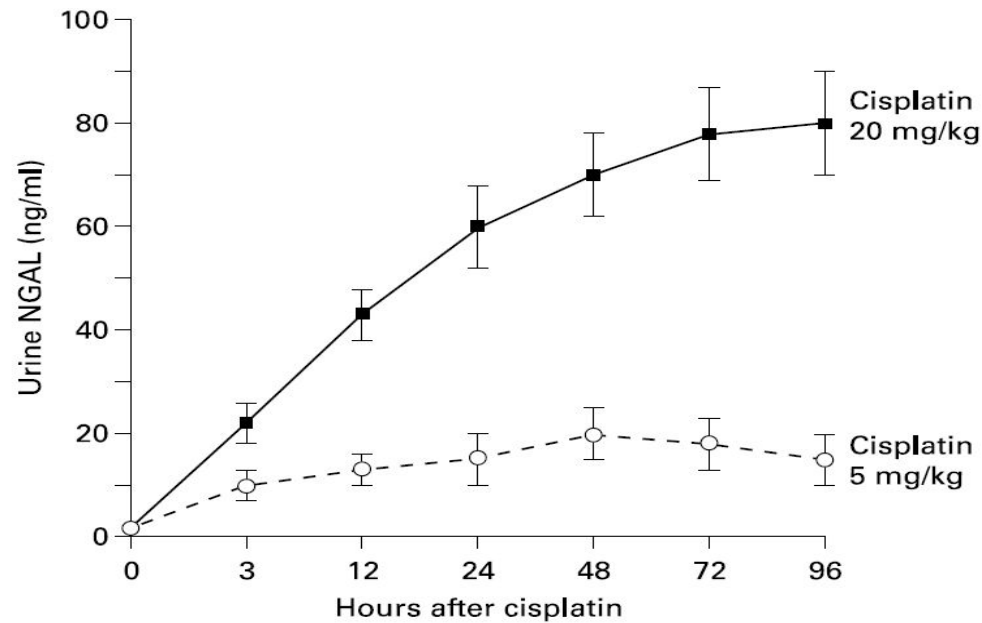
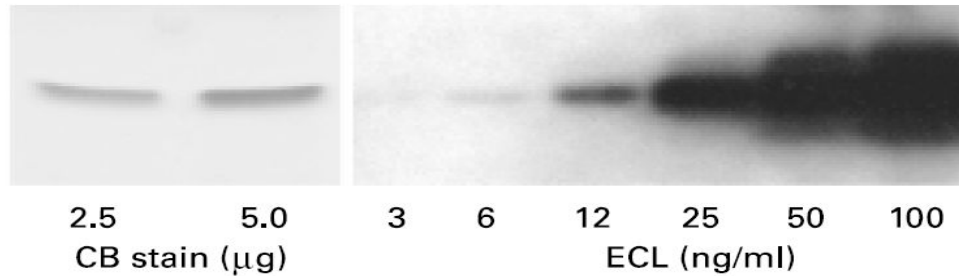
При повреждении почек, **мРНК** белка NGAL синтезируется преимущественно в петле Генле

(гибридизация *in situ*)

Schmidt, Ott et al., JASN, 2007

Urinary NGAL после терапии цисплатином

Mishra J et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 2004;24:307-315.



u-NGAL в моче (u-urinary)

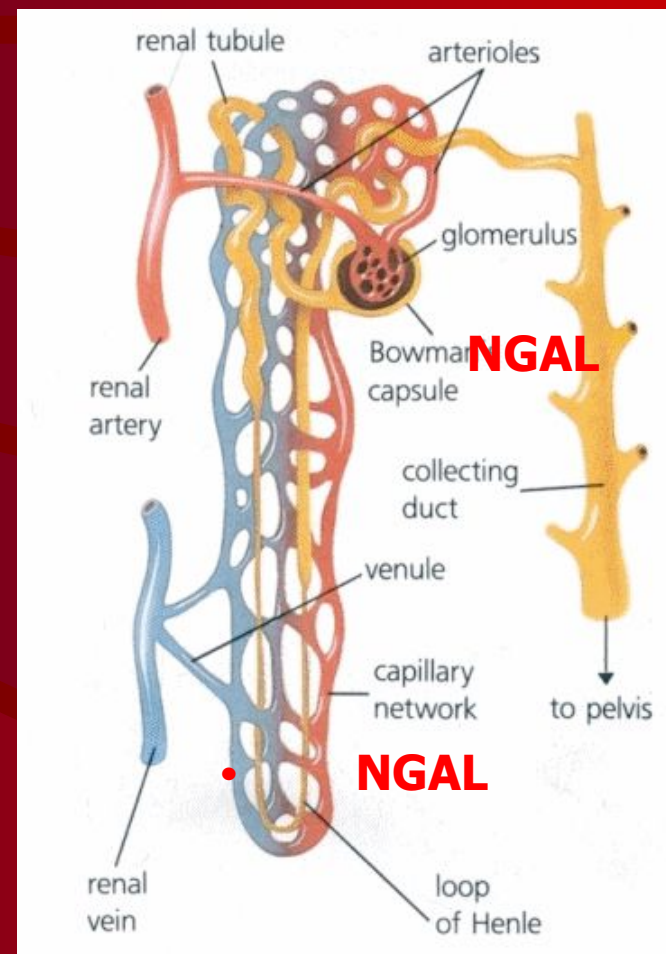
Экскреция NGAL в мочу

происходит только когда связана:

- с повреждением проксимальных ренальных канальцев,
- и/или с повышением синтеза NGAL в канальцах *de novo*.

При ОПП происходит быстрый и массовый синтез NGAL в восходящем колене петли Генле и в собирательных трубках

Именно такой, «ренальный» NGAL составляет наибольшую фракцию NGAL в моче



s-NGAL при ОПП

- *В сыворотке* повышаются уровни **NGAL**, синтезированного вне почек – **s-NGAL (serum)**,
- **s-NGAL** поступает в почки и реабсорбируется в проксимальных канальцах, в мочу **НЕ ВЫХОДИТ**,
- функция **s-NGAL** при ОПП - ограничение и/или уменьшение тяжести повреждений в проксимальных канальцах

u-NGAL при ОПП

Синтезируется *de novo*:

- в тонких восходящих окончаниях петли Генле и
 - в собирательных трубках,
 - поступает в мочу
- и, как бактериостатик,
«спасает» от инфекций
мочевого тракта

NGAL при развитии ОПП

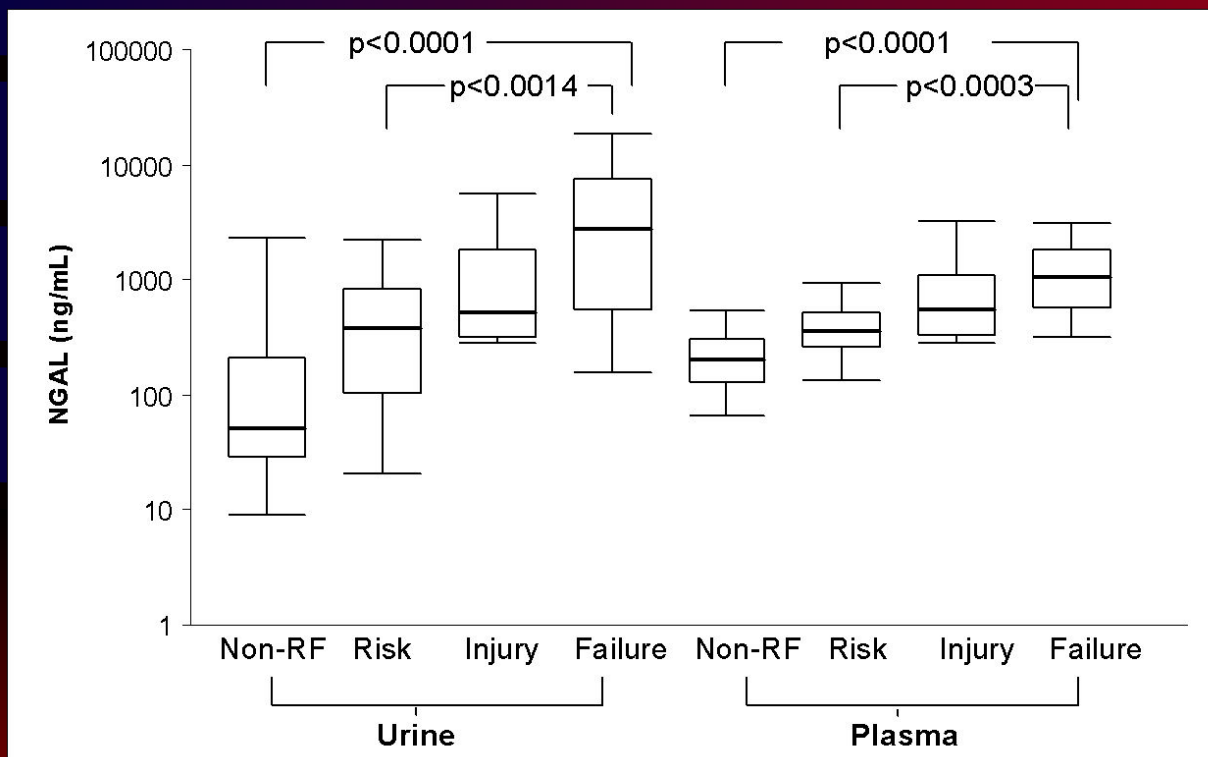
В течение 2-х часов повышается:

- в сыворотке - в 7 — 16 раз,

- в моче - в 25 — 1000 раз!

Уровни NGAL повышаются с тяжестью ренальной дисфункции

нг/мл



Моча

Плазма

Критерии тяжести ОПП

RIFLE

R: Risk - Риск

I: Injury - Повреждение

F: Failure - Недостаточность

L: Loss - Утрата

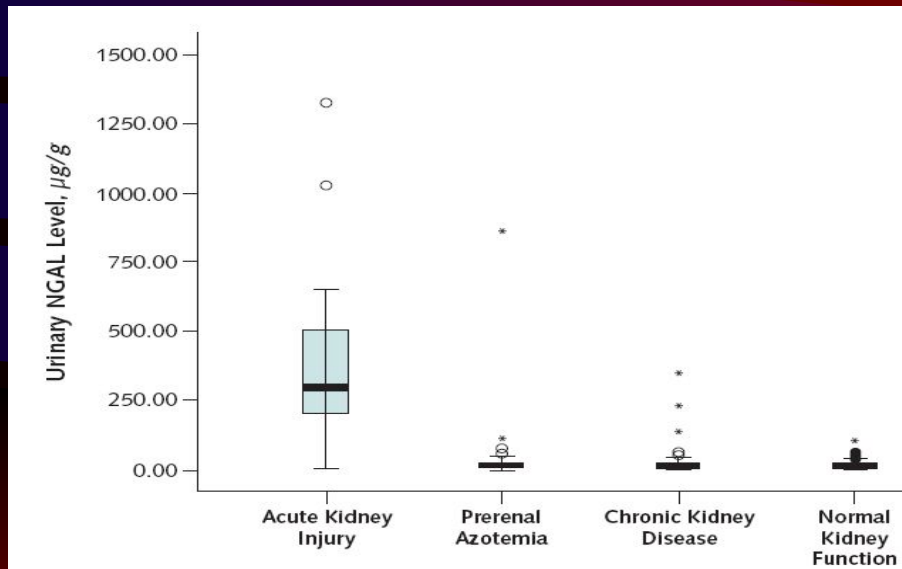
E: End stage -

Терминальная стадия

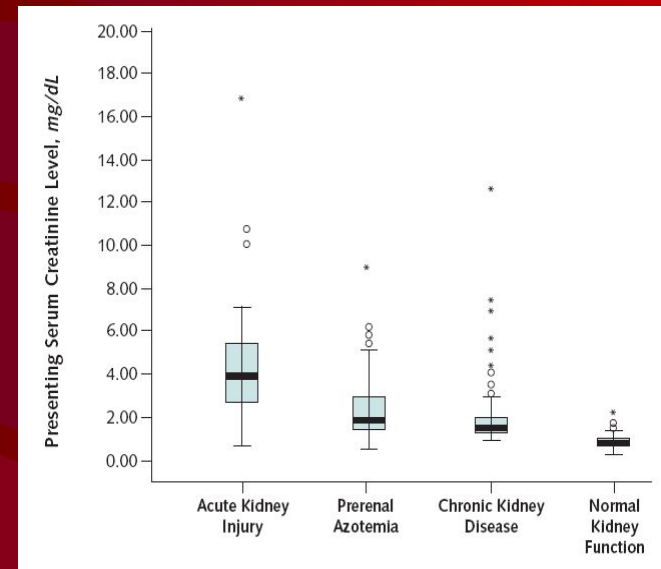
135 пациентов,
поступивших в ОНТ

Уровни u-NGAL в различных диагностических группах

Urinary NGAL



Креатинин сыворотки



Nickolas, et al. Ann Intern Med

2008

«Однократное измерение NGAL в моче помогает отличать ОПП:

- от нормального функционирования почек,**
- от преренальной азотемии ,**
- от хронических ренальных заболеваний и, также**
- позволяет прогнозировать неблагоприятный исход.»**

«...уровень u-NGAL идентифицирует ОПП у широкого спектра пациентов с разными механизмами ОПП»

«...уровни u-NGAL остаются высоко диагностическими даже тогда, когда временные характеристики повреждения неизвестны, что делает применение NGAL потенциально диагностическим для ренальных заболеваний с многими клиническими манифестациями»

Что такое **суб**клиническое ОПП?

Journal of the American College of Cardiology
© 2011 by the American College of Cardiology Foundation
Published by Elsevier Inc.

Vol. 57, No. 17, 2011
ISSN 0735-1097/\$36.00
doi:10.1016/j.jacc.2010.11.051

Cardiac Biomarkers

The Outcome of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin-Positive Subclinical Acute Kidney Injury

A Multicenter Pooled Analysis of Prospective Studies

Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Cruz DN, Wagener G, Krawczeski CD, Koyner JL, Murray P, Zappitelli M, Goldstein SL, Makris K, Ronco C, Martensson J, Martling CR, Venge P, Siew E, Ware LB, Ikizler TA, Mertens PR.

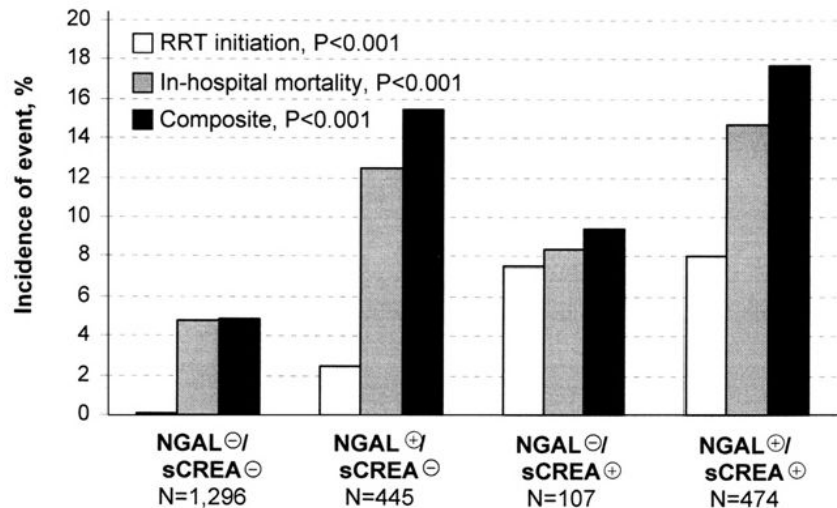


Figure 3 Incidence of Events

Incidence of RRT initiation, in-hospital mortality, and a combination of both according to NGAL and sCREA. There was a stepwise increase in all outcomes. Abbreviations as in Figures 1 and 2.

Критические пациенты Кардиоренальный синдром

1296 (55.8%)	sNGAL(-)/sCREA(-),
445 (19.2%)	<u>sNGAL(+)/sCREA(-),</u>
107 (4.6%)	sNGAL(-)/sCREA(+),
474 (20.4%)	sNGAL(+)/sCREA(+).

Ренальная заместительная терапия

sNGAL(-)/sCREA(-): RRT - 0.0015% ;

sNGAL(+)/sCREA(-): RRT - 2.5% ,

sNGAL(-)/sCREA(+): RRT - 5%,

sNGAL(+)/sCREA(+): RRT - 8.0%,

Госпитальная смертность

4.8%,

12.4%,

8.4%,

14.7%

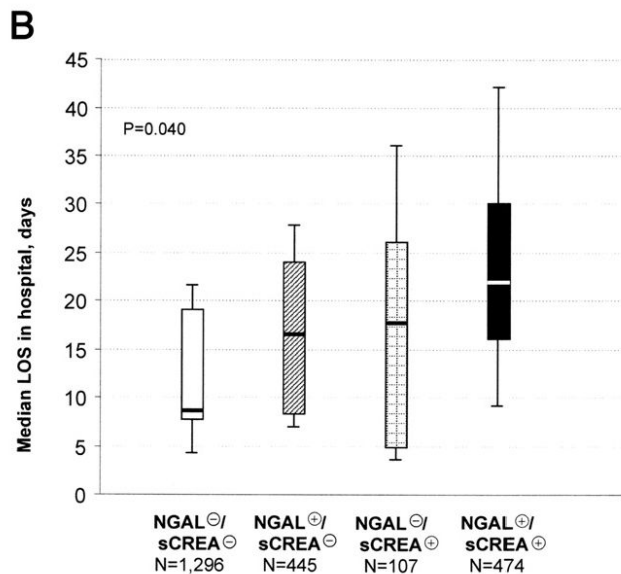
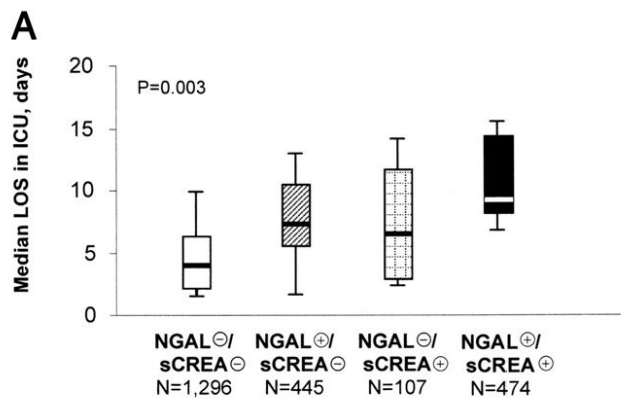


Figure 4 Median LOS in ICU

Length of stay (LOS) stratified by NGAL and sCREA in the intensive care unit (ICU) (A) and in-hospital (B). There was a stepwise increase in median LOS in ICU and in-hospital. Abbreviations as in Figures 1 and 2.

Критические пациенты Кардиоренальный синдром

	Количество дней в ОИТ	в госпитале
sNGAL(-)/sCREA(-):	4.2	8.8
<u>sNGAL(+)/sCREA(-):</u>	<u>7.1</u>	<u>17.0</u>
sNGAL(-)/sCREA(+):	6.5	17.8
sNGAL(+)/sCREA(+):	9.0	21.9

The Outcome of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin-Positive Subclinical Acute Kidney Injury

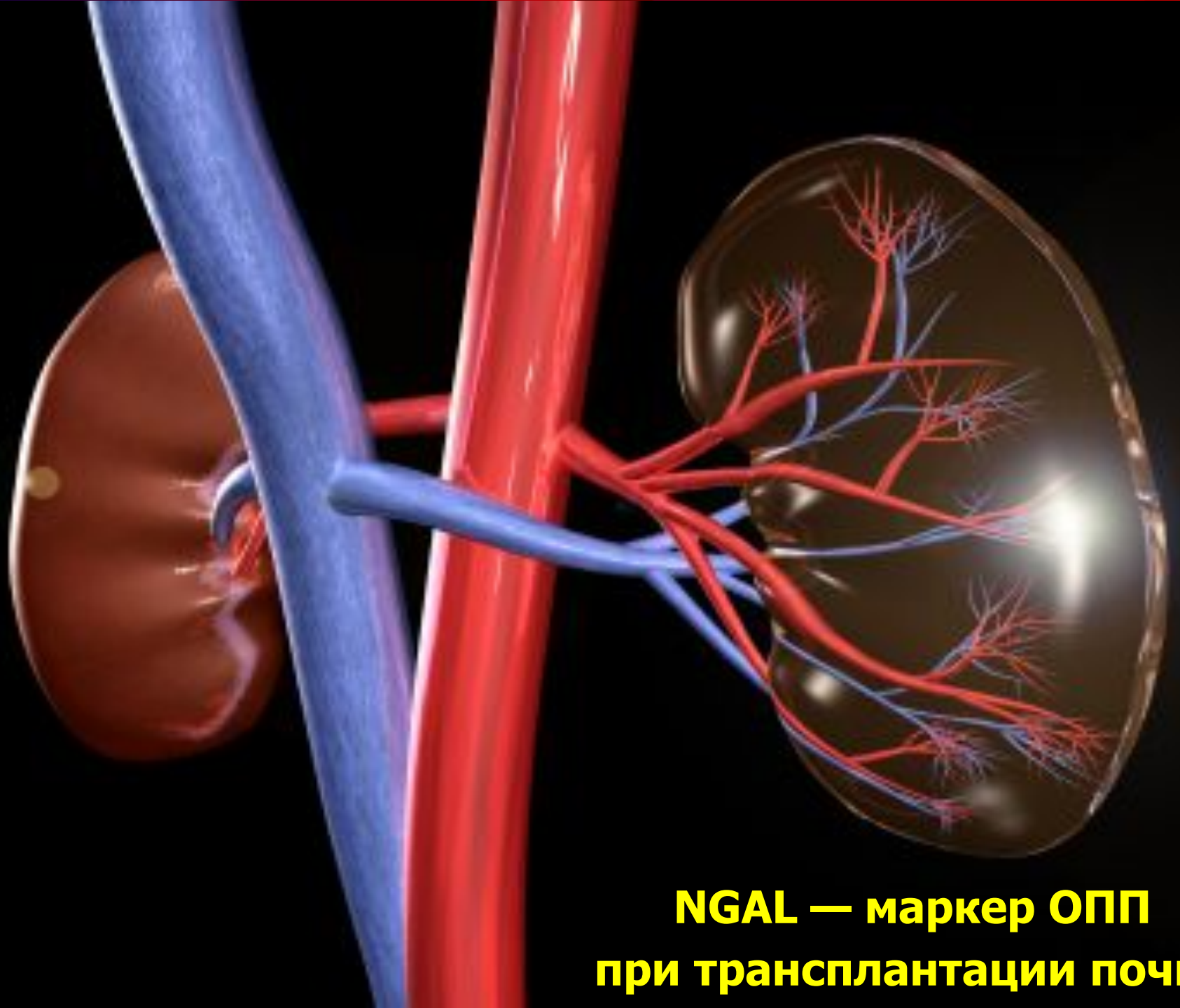
A Multicenter Pooled Analysis of Prospective Studies

Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Cruz DN, Wagener G, Krawczeski CD, Koyner JL, Murray P, Zappitelli M, Goldstein SL, Makris K, Ronco C, Martensson J, Martling CR, Venge P, Siew E, Ware LB, Ikizler TA, Mertens PR.

При отсутствии диагностического повышения сывороточного креатинина sNGAL выявляет пациентов с вероятным субклиническим ОПП, имеющих повышенный риск неблагоприятных исходов.

Концепция и определение ОПП могут нуждаться в пересмотре

«In the absence of diagnostic increases in serum creatinine, NGAL detects patients with likely subclinical AKI who have an increased risk of adverse outcomes. The concept and definition of AKI might need re-assessment.»



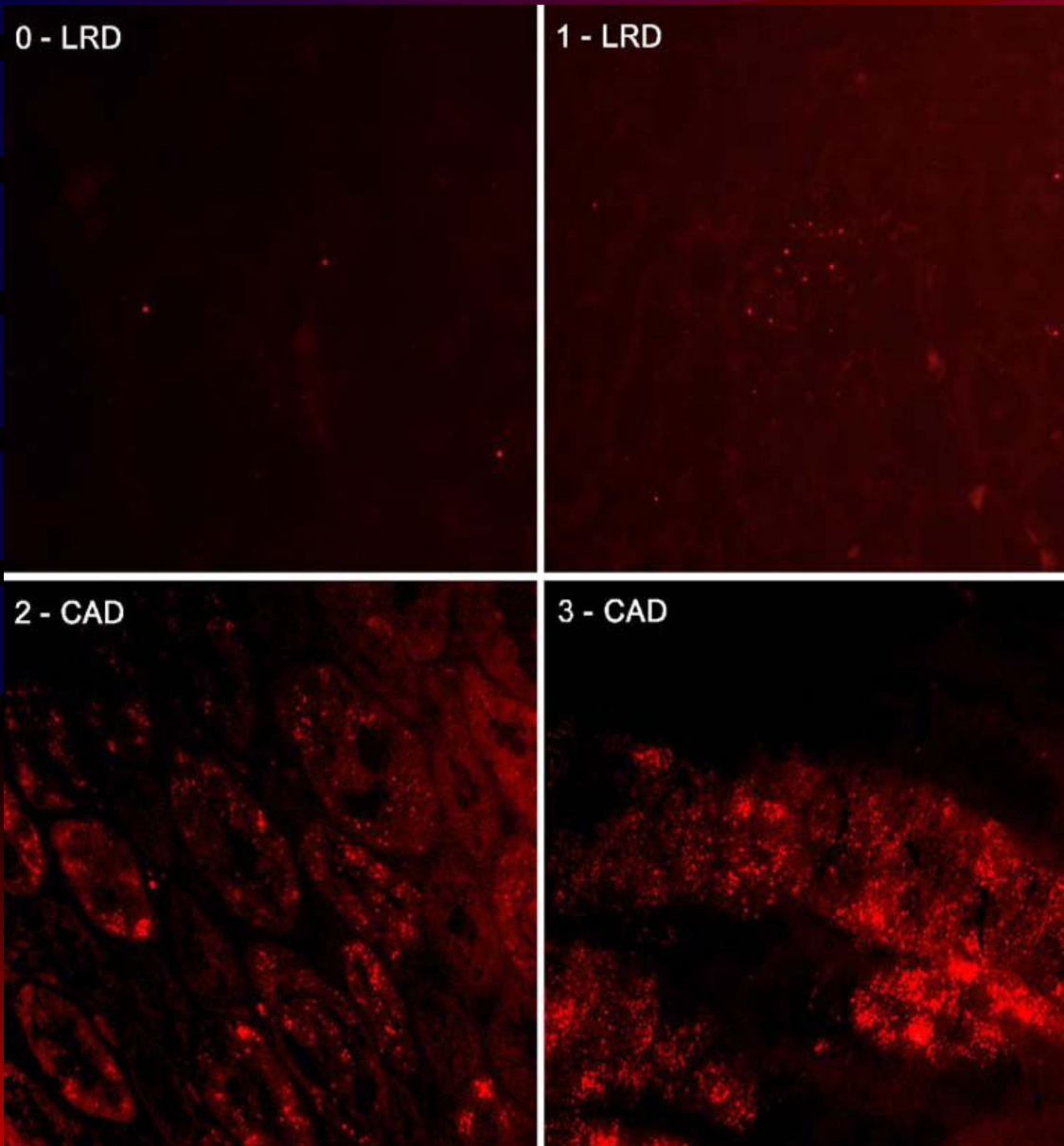
**NGAL — маркер ОПП
при трансплантации почки**

**Yaya Mishra, Qing Ma, Caitlin Kelly, Mark Mitsnefes,
Kiyoshi Mori, Jonathan Barasch, Prasad Devarajan.**

Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation

- **Pediatr Nephrol (2006) 21: 856–863**

NGAL staining intensity in early protocol biopsies represents a novel predictive biomarker of acute kidney injury following transplantation



Representative images of NGAL staining of protocol kidney biopsy samples obtained about 1 hr after vascular anastomosis in living-related donor (LRD, top panels) and cadaveric (CAD, bottom panels) kidney transplants.

The intensity of NGAL staining was graded As 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (intense)

Биопсия, проведенная через 1 ч после наложения сосудистых анастомозов, показала корреляцию между интенсивностью специфического гистохимического окрашивания NGAL и последующим развитием отсроченной функции трансплантата

Mishra J, Ma Q, Kelly C *et al.* Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation.

Pediatr Nephrol 2006; 21: 856–863

Проспективное многоцентровое исследование (взрослые и дети): u-NGAL, повышенный через сутки после ТП, выявлял пациентов, у которых через 2-4 суток развивалась отсроченная функция трансплантата

Parikh CR, Jani A, Mishra J *et al.* Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 1639–1645

Плазменные уровни NGAL коррелировали с отсроченной функцией трансплантата при трансплантации от доноров, скончавшихся от кардиальной смерти.

Kusaka M, Kuroyanagi Y, Mori T *et al.* Serum neutrophil gelatin associated lipocalin as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *Cell Transplant* 2008; 17: 129–34

ПОСТОПЕРАЦИОННЫЕ УРОВНИ u-NGAL – ПРЕДИКТОРЫ ОФТ

Рекомендуемый пограничный уровень u-NGAL в первый день после трансплантации:

NGAL, нг/мл	Чувствительность	Специфичность
75	0,9	0,16
125	0,9	0,25
450	0,9	0,48
700	0,9	0,62
1000	0,9	0,83
2000	0,8	0,93

Пограничный уровень u-NGAL - предиктор необходимости диализа в течение 1 недели после трансплантации:

u-NGAL, нг/мл	Чувствительность	Специфичность	Положительное предиктивное значение	Отрицательное предиктивное значение
45	0,97	0,26	0,45	0,93
350	0,77	0,74	0,62	0,85
800	0,65	0,94	0,86	0,82

Parikh CR, Jani A, Mishra J et al. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. Am J Transplant. 2006; 6(7):1639-45.

Hall IE, Yarlagadda SG, Coca SG, et al. IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation. J Am Soc Nephrol. 2010; 21(1):189-97.



**NGAL — предиктор ОПП
после кардиохирургии**

Ежегодно в мире

1 млн человек

**повергаются кардиохирургии,
у 30% из них развивается ОПП,**

что приводит:

- к высокой летальности,**
- увеличению сроков госпитализации,**
- зависимости от диализа,**
- высокому риску инфекционных осложнений,**
- ухудшению качества жизни**

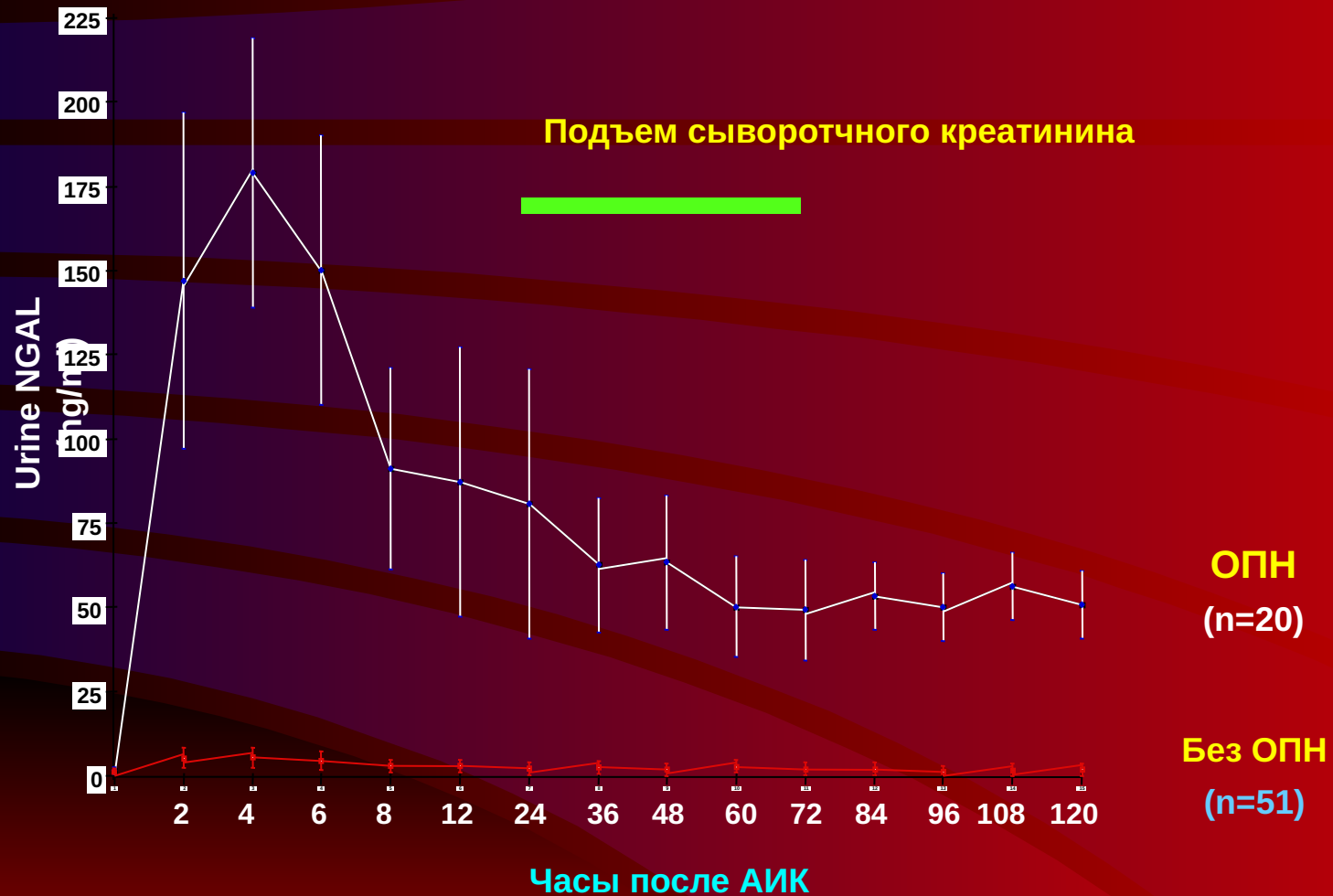
Rosner MH et al. Cardiac surgery as a cause of acute kidney injury: pathogenesis and potential therapies. J Intensive Care Med 2008;23:3–18.

s-NGAL через 6 ч после АИК в зависимости от тяжести ОПП

Стадия ОПП	N пациентов	AUC-ROC (95% CI)	Чувствитет.	Специфичн.	Cut-Off (нг/мл)
1	29	0,75 (0,59-0,92)	71,4	73,7	> 150
2	11	0,78 (0,59-0,99)	80,0	80,0	< 150
3	6	0,01 (0,58-1,00)	66,7	100,0	> 240
2+3	7	0,79 (0,57-0,99)	75,0	78,9	> 150

Вывод. У взрослых пациентов, перенесших кардиохирургическое вмешательство, предиктивные уровни s-NGAL возрастают с тяжестью ОПП

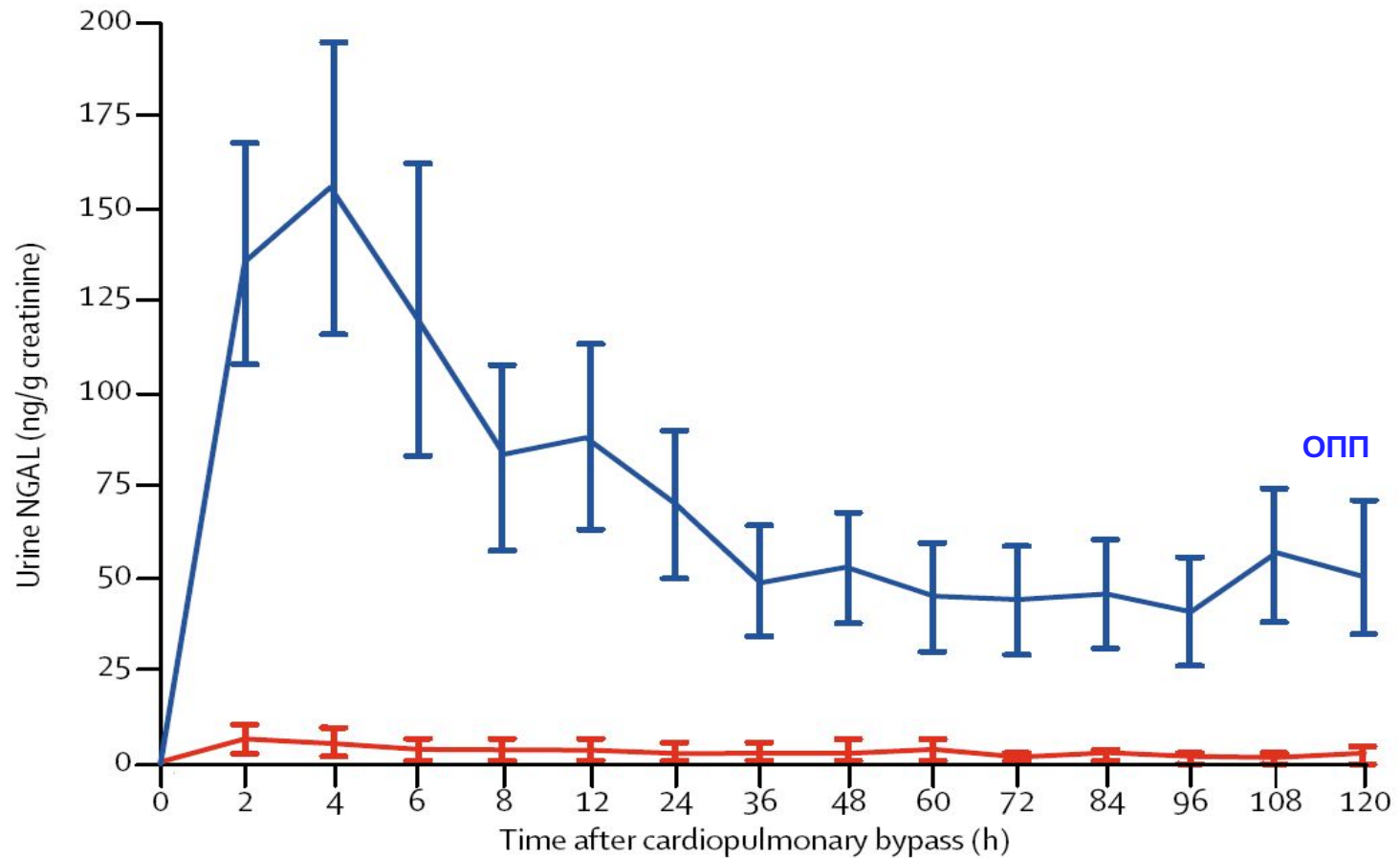
Динамика u-NGAL после АИК



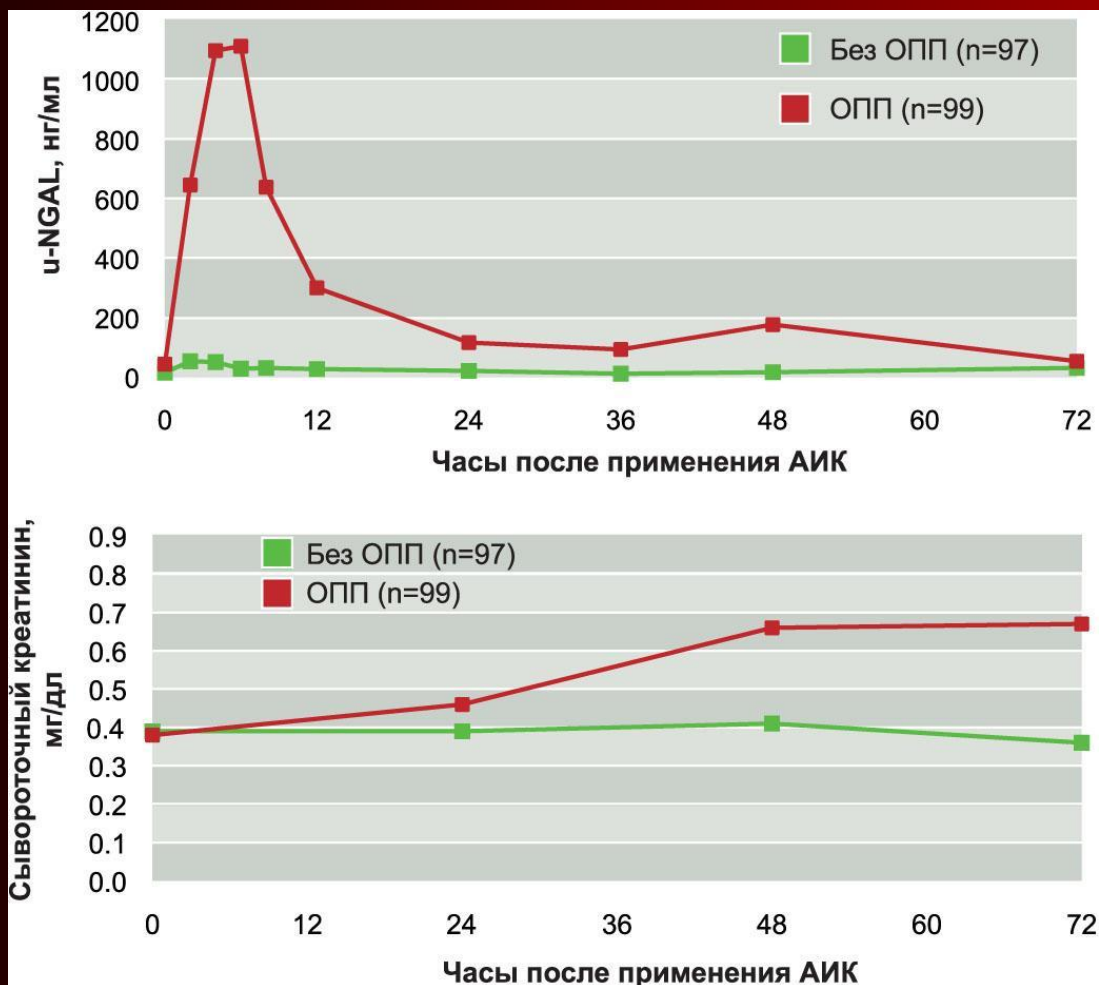
Urine NGAL is upregulated 15-fold within 2 hours after CPB in patients who later develop ARF

Mishra J et al: Lancet
2005

Динамика u-NGAL (нг/г креатинина) после АИК



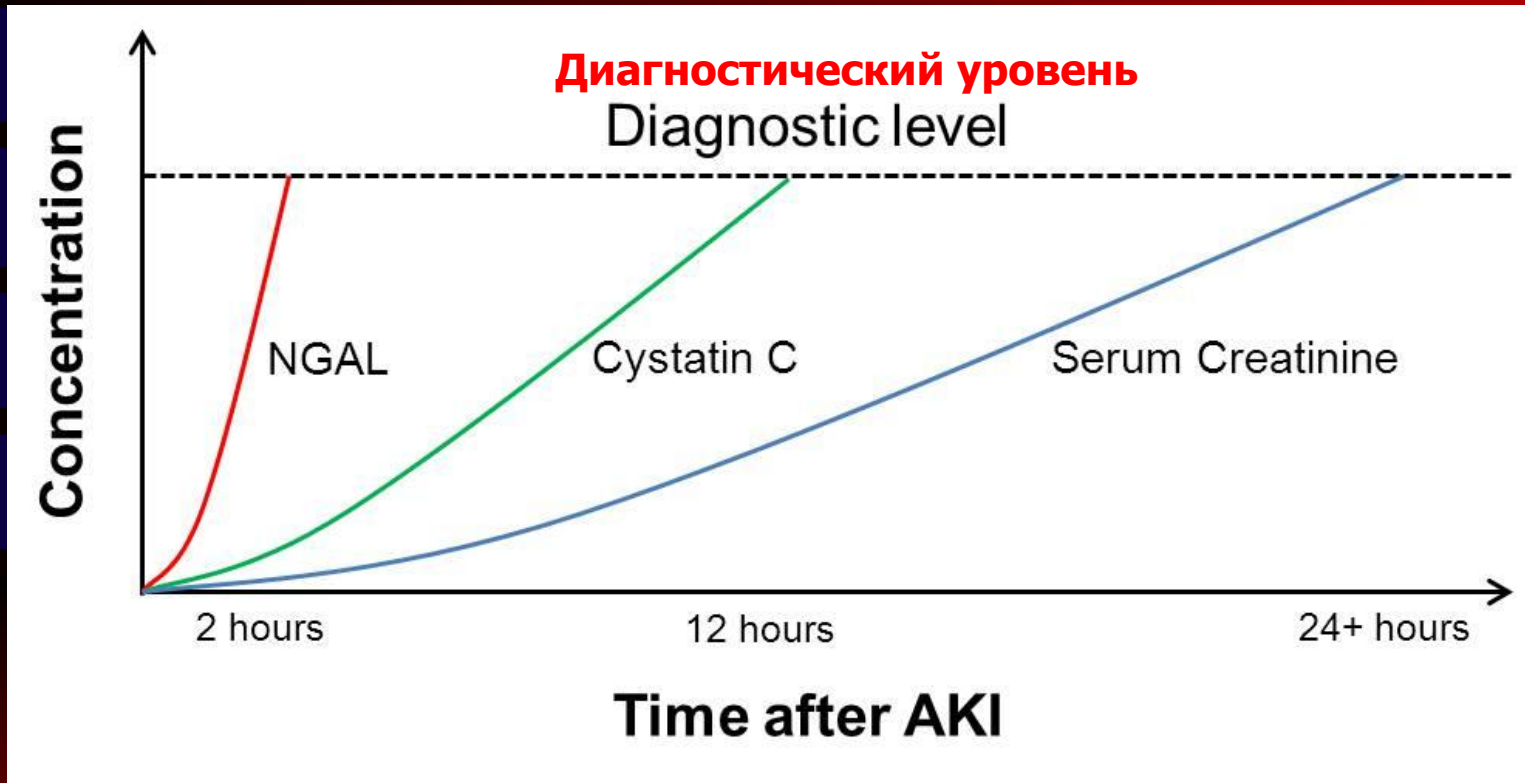
Динамика u-NGAL и креатинина после кардиохирургии с АИК



**В течение 2 ч после применения АИК
уровень и-NGAL
возрастает в 15 раз
и указывает
на последующее развитие ОПН**

Mishra J et al: Lancet 2005

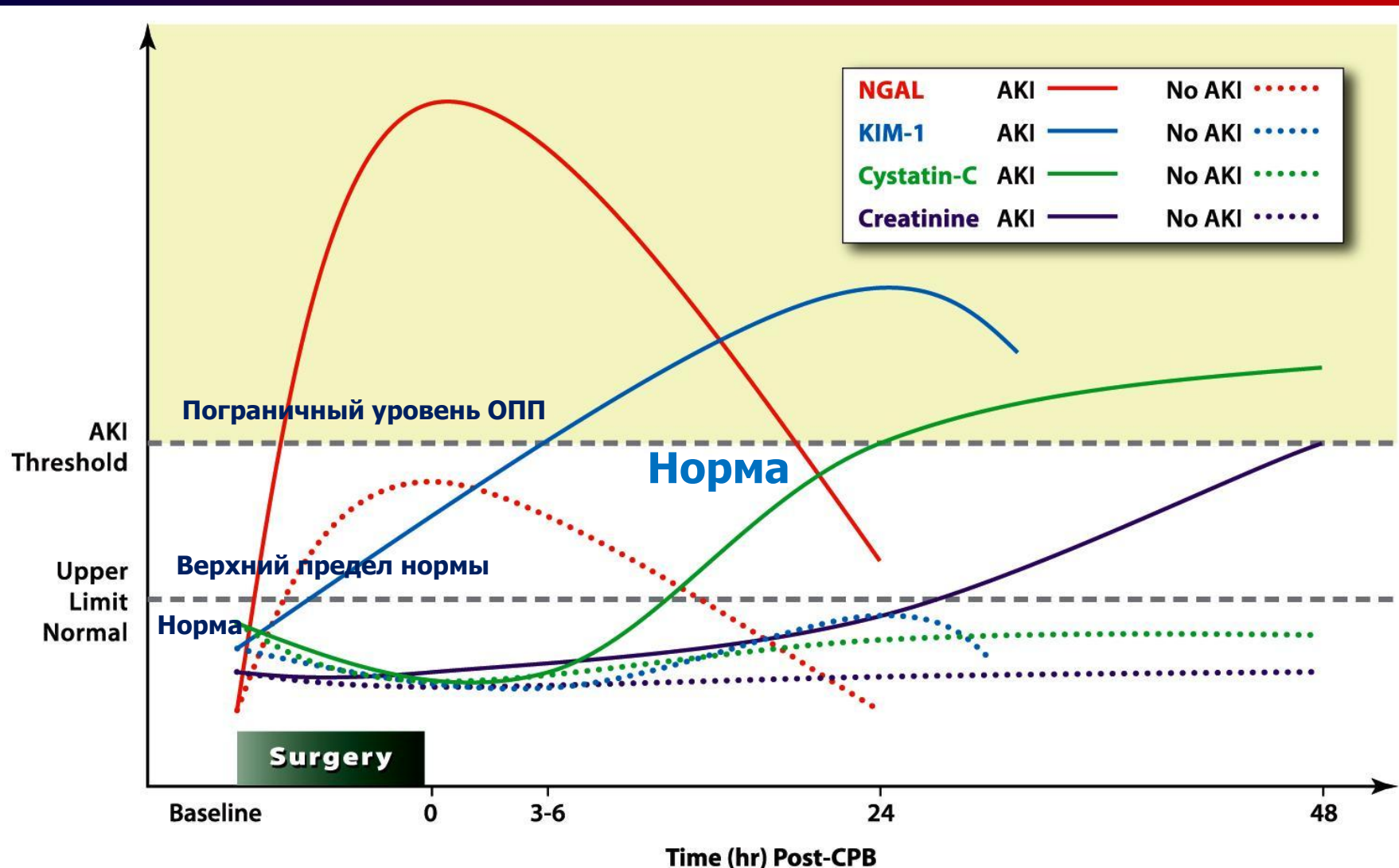
Динамика ренальных маркеров при развитии ОПП



час

Время после начала развития ОПП

Динамика ренальных маркеров после кардиохирургии с АИК



u-NGAL и АИК

«u-NGAL levels measured at several early time points after CPB were excellent biomarkers for the subsequent development of AKI and its complications.»

«The magnitude of rise supports the notion that urine NGAL ... (would) allow for easy risk stratification.»

«Urine NGAL was associated with key clinical factors, including length of stay, days in AKI, need for dialysis, and death».

«... availability of promising early biomarkers may enable the timely initiation of interventions»”

«Измерение u-NGAL через короткие промежутки времени после применения АИК - отличный маркер последующего развития ОПП и его осложнений»

«Степень подъема u-NGAL поддерживает точку зрения, что u-NGAL позволяет легкое проведение стратификации риска»

«U-NGAL связан с ключевыми клиническими факторами: длительностью госпитализации, количеством дней в состоянии ОПП, необходимостью диализа и смертностью»

«применение этого многообещающего раннего биомаркера позволяет своевременно начинать лечение»

Превентивная терапия ОПП: бикарбонат натрия предотвращает повышение *u-NGAL* после кардиохирургии

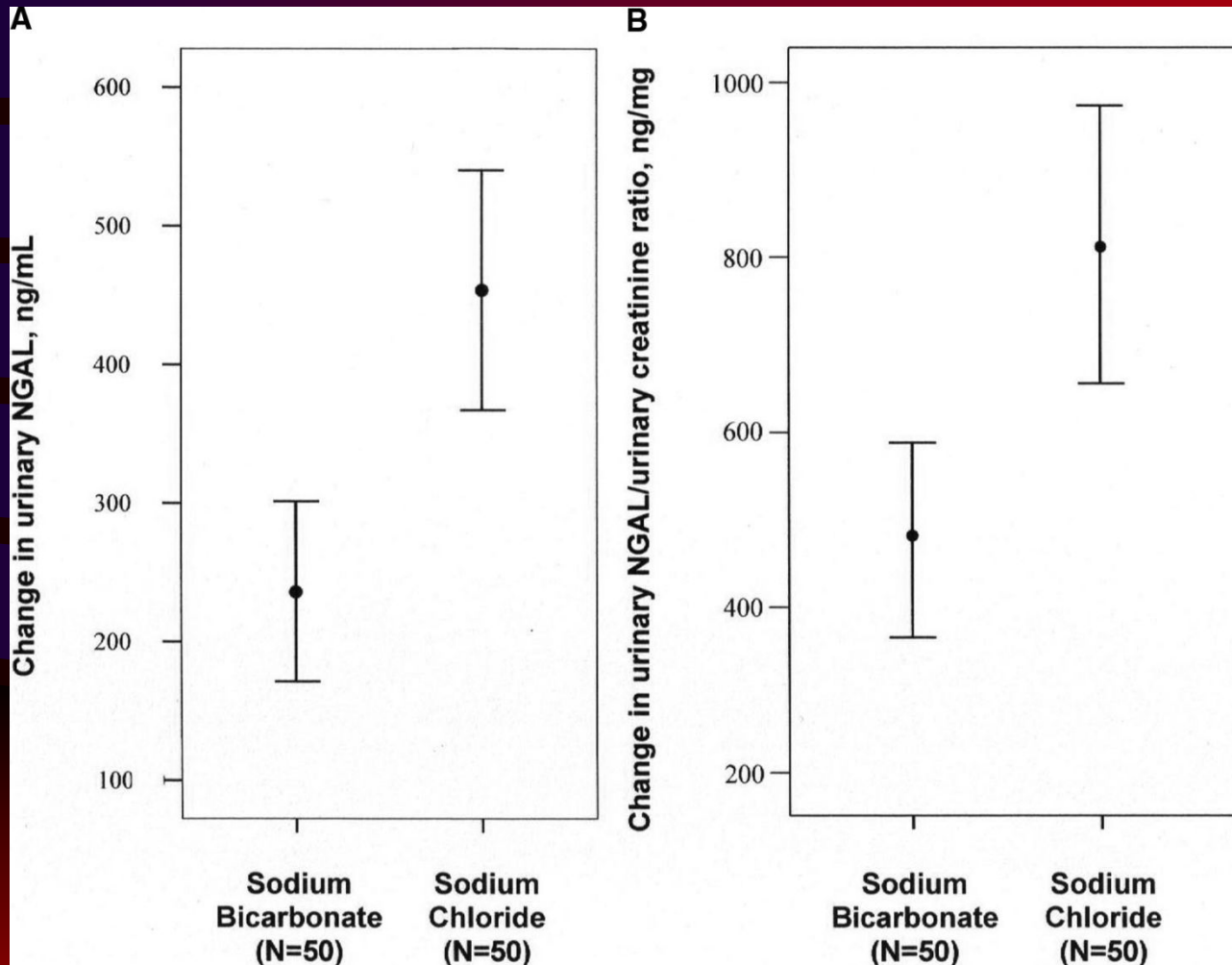
Patients: Cohort of 100 cardiac surgical patients at increased risk of postoperative acute renal dysfunction.

Intervention: Patients were randomized to either 24 hrs of intravenous infusion of sodium bicarbonate (4 mmol/kg) or sodium chloride (4 mmol/kg).

Conclusions: *Sodium bicarbonate loading and continuous infusion* was associated with a lower incidence of acute renal dysfunction in cardiac surgical patients undergoing cardiopulmonary bypass. The findings of this pilot study justify further investigation.

(ClinicalTrials.gov, NCT00334191).

и-NGAL после АИК и инфузии SodBic



В группе с инфузией SodBic ОПП развилась у 16 (32%) пациентов, в контрольной группе (инфузия NaCl) — у 26 (52%).

Сочетанное измерение уровней s-NGAL и u-NGAL



при операциях с АИК и трансплантациях

- **u-NGAL** измеряют до и после и получают однозначный ответ о развитии ОПП.
- **Весьма полезно сочетанное измерение u-NGAL и s-NGAL:**
- **Повышенный s-NGAL - указание на ОФ.**
- **Если s-NGAL, исходно повышенный перед операцией, еще больше повышается и после нее –**
- **это дополнительное указание на острое ренальное повреждение**

AKI = 50% or greater increase in serum creatinine from baseline
DGF = dialysis requirement within the first week after transplant



NGAL — ранний маркер ОПП

АИК Cardiopulmonary Bypass (CPB)
2 ч после СЛШ, за 2 дня до ОПП
ROC 0.91-0.99 (1-5)

Сепсис или ОИТ
Sepsis or ICU Setting
За 2 дня до ОПП
ROC 0.78 (8, 9)

Контрастер нефротоксичный
Contrast induced Nephropathy

Через 2 ч после введения
контрастера
За 1-2 дня до ОПП
ROC 0.92 (6, 7)

Трансплантация почки
Kidney Transplant (tx)

Через 12 ч после ТП
За 2-3 дня до ОФТ
ROC 0.90 (10, 11)

1. Dent et al, Crit Care 2007, 11(6):R127 (P)
2. Bennett et al, CJASN 2008, 3:665-73 (U)
3. Mishra et al, Lancet 2005, 365:1231-1238 (U+P)
4. Portilla et al, KI 2008, 4:465-72 (U)
5. Wagener et al: Anesthesiol 2006, 105: 485-491 (U; AUC 0.78)
6. Mitsnefes et al, Ped Nephrol 2007, 22:101-8 (U+P)

7. Bachorzewska-Gajewska et al, NDT 2007, 22:295-6 (U+P)
8. Zappitelli et al, Crit Care 2007, 11(4):R84 (U)
9. Wheeler et al, Crit Care Med 2008, 4:1297-303 (P)
10. Parikh et al, Am J Transplant 2006, 6:1639-45 (U)
11. Kusaka et al, Cell Transplant 2008, 17:1-6 (P)

U=Urine P=Plasma

NGAL – ранний маркер ОПП



Моча

Источник:

- дистальные канальцы и
- собирательные трубки

Функция:

- стимулирует выживание и пролиферацию тубулярных клеток и ограничивает их апоптоз
- связывает Fe

Ранний маркер повреждения почек

Сыворотка

Источник:

- нейтрофилы,
- макрофаги,
- эпителиальные клетки легких и печени

Функция:

- реактант острой фазы воспаления

Маркер взаимодействия органов (organ cross-talk) при ОПП

Показания к измерению и-NGAL



NGAL

Пациенты отделений неотложной и интенсивной терапии;
Серьезная ренальная патология;
Острая сердечная недостаточность;
Применение нефротоксичных препаратов и контрастеров;
Кардиохирургия с применением АИК;
Трансплантация почки и печени

**1-часовой иммуноферментный тест
(96-луночный стрипованный)**

Для открытых ИФА-анализаторов

**Срок хранения реагентов – 24 месяца,
в т.ч. вскрытых флаконов**

С 2011 г

**Диапазон определения:
50-500 нг/мл для мочи и
100-500 нг/мл для плазмы
(станд. разведение)**



The NGAL Test™ - – a new rapid NGAL assay for clinical chemistry platform

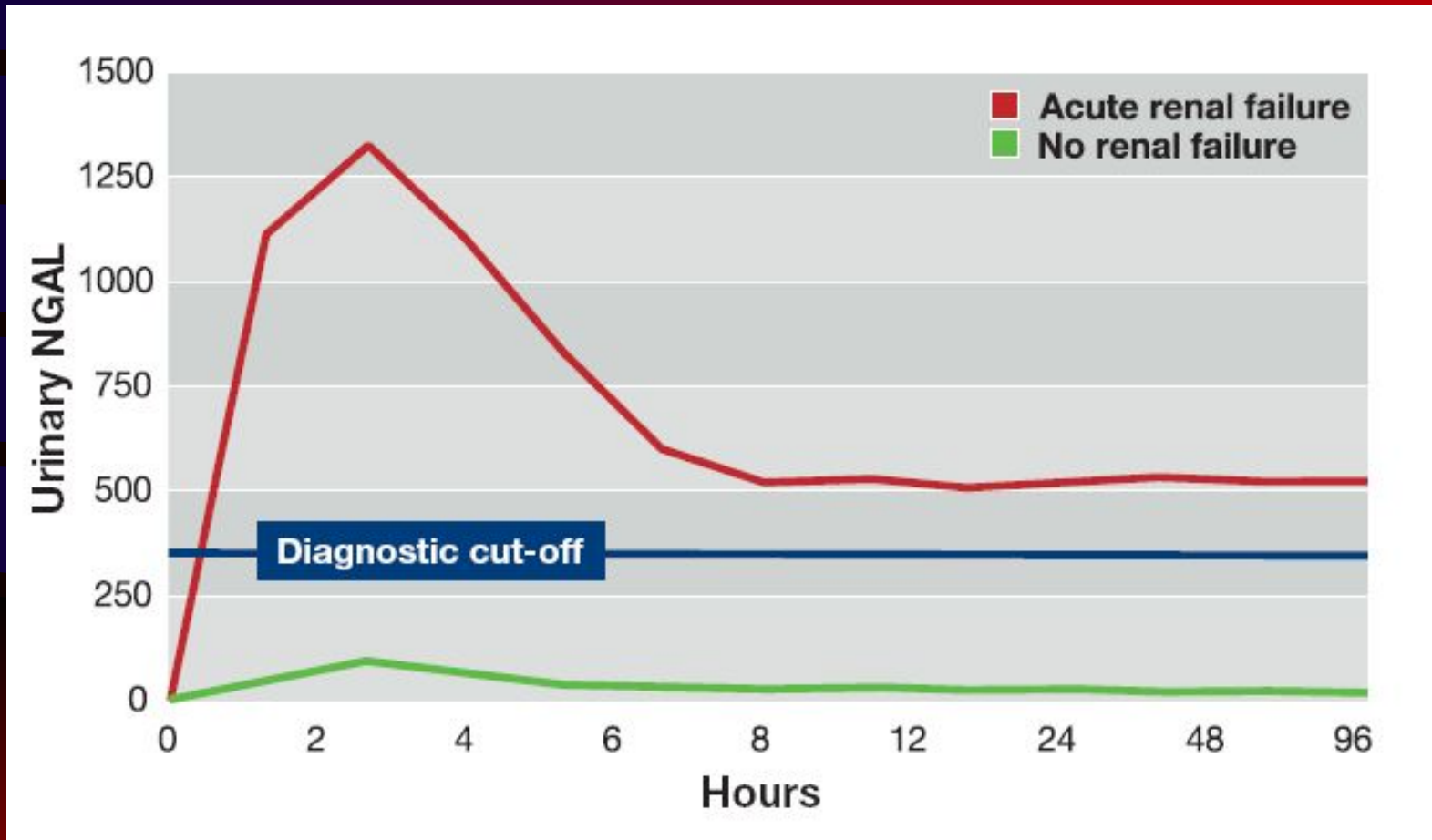
Иммунотурбидиметрический тест
для открытых
биохимических
анализаторов

Диапазон измерений 25 - 5000 нг/мл
Время определения – 10 мин



С 2012 г

NGAL Rapid ELISA & IT Kits BioPorto



Cut-off: 350 нг/мл моча
400 нг/мл плазма

**Мы работаем
больше,
чтобы вы
сомневались
меньше**



salesale@sale@diakonsale@diakonlab.ru

www.diakonlab.ru

142290, Пушкино, МО, пр. Науки 5.
Тел.: (495) 980 6339; 980 6338.
Тел\факс: (495) 980 6679

117452, Москва,
Внутренний проезд, д. 8, строение 9,
Тел.: (499) 788-7810, 788-7811
Тел\факс: (499) 788-7812