



Barbara Lisowska-Myjak

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007–2008 jako projekt badawczy N N405 2519 33

Laboratoryjne wskaźniki ostrego uszkodzenia nerek oznaczane w moczu i w surowicy

Laboratory markers of acute kidney injury detected in serum and urine

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is a common clinical problem associated with increased morbidity and mortality, affecting seriously ill patients. Traditional blood and urine markers are insensitive and non-specific for detection of early kidney injury with limited and unsatisfactory prediction of outcome and therapeutic procedures in AKI.

The study presents new candidates for biochemical laboratory markers, casually related to the pathogenesis and development of AKI, it also analyzes the possibility of determining them in serum and urine. Some of those parameters are well known in laboratory routine, while others are results of recently published scientific research, which need further investigation and validation in clinical trials. Currently AKI is generally defined as an abrupt and sustained serum creatinine concentration increase although this marker is delayed and inadequate for the actually renal lesion accompanying the developing AKI. The most promising AKI markers detected in serum were: cystatin C, NGAL (neutrophil-gelatinase associated lipocalin) and uric acid. Urinary AKI markers could

be classified as: enzymes released from damaged renal tubular cells (alkaline phosphatase, gamma-glutamyltranspeptidase, alanine aminopeptidase, isoenzymes of glutathione transferase, N-acetyl-β-D-glucosaminidase), urinary low-molecular weight proteins (< 40 kD) (alfa-1-microglobulin, beta-2-microglobulin, retinol binding protein, cystatin C) and proteins produced in kidney specifically connected with the pathogenesis and development of AKI: CYR-61 (cysteine-rich protein 61), NGAL, KIM-1 (kidney injury molecule-1), cytokines and chemokines (Gro-α, IL-18) and structural and functional proteins of renal tubule (F-actin, Na⁺/H⁺ exchanger isoform-3).

Based upon the differences between expression of presented markers in kidney, serum and urinary proteins profile may be useful for determination of the aetiology of AKI, disease duration kidney injury severity, as well as for predicting the disease progression and monitoring treatment response.

Forum Nefrologiczne 2010, vol. 3, no 2, 71–81

Key words: acute kidney injury, cystatin C, NAG, NGAL, IL-18, KIM-1

Definicja ostrego uszkodzenia nerek (AKI, *acute kidney injury*) dotyczy gwałtownego pogorszenia czynności nerek utrzymującego się w czasie, prowadzącego do nagromadzenia się

w ustroju azotowych i nieazotowych produktów przemiany materii, toksyn oraz głębokich zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej. Jest to choroba o wysokim stopniu zachorowalności

Adres do korespondencji:

dr n. med. Barbara Lisowska-Myjak
Katedra i Zakład Biochemii
i Chemii Klinicznej,
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1, 02–097 Warszawa
tel.: (22) 572 07 35, faks: (22) 572 07 35
e-mail: basia.myjak@interia.pl

▶▶ U około 80% pacjentów z AKI stwierdza się śmierć komórek kanalików, a nie ostre choroby kłębuszków lub miąższu ◀◀

i śmiertelności, dla której ciągle poszukuje się skutecznej interwencji terapeutycznej. Częstość występowania AKI waha się od 5% u pacjentów szpitalnych do 30–50% u pacjentów z oddziałów intensywnej pomocy medycznej. Śmiertelność wśród pacjentów z oddziałów intensywnej pomocy medycznej z powikłaniem AKI jest 5-krotnie wyższa w porównaniu z pacjentami bez tej komplikacji [1–7].

Brak jednoznacznej opinii dotyczącej częstości występowania, zachorowalności i śmiertelności spowodowanej przez AKI prawdopodobnie w dużym stopniu zależy od różnych definicji tej choroby. Grupa ekspertów z dziedziny nefrologii i intensywnej opieki lekarskiej (*The Acute Dialysis Quality Initiative-ADQI Working Group*) zaproponowała standaryzację definicji AKI u osób dorosłych, wykorzystując nowy system klasyfikacji objawów klinicznych i laboratoryjnych tej choroby [2, 8]. Na podstawie międzynarodowych i międzydiscyplinarnych kryteriów, zawartych w skrócie RIFLE (*Risk, Injury, Failure, Loss i End-stage renal disease*), ocenia się ryzyko, uszkodzenie i zniszczenie oraz prognozuje się stopniowy rozwój choroby nerek (utrata funkcji i schyłkową niewydolność). Kryteria RIFLE opierające się na oznaczaniu kreatyninemia są użytecznym sposobem oceniania kolejnych stadiów rozwoju niewydolności, chociaż wykazują niedostateczną czułość dla wykrywania wczesnych zmian wewnątrznerkowych [1, 9, 10].

Dewastacyjny przebieg AKI wyjaśnia powszechny w ostatnim czasie wzrost zainteresowania klinicystów skuteczną ochroną przed skutkami tej choroby, opartą na jej wczesnym wykrywaniu, ocenie intensywności przebiegu i rokowania oraz wprowadzenia satysfakcjonującego leczenia [11–13]. Szczególnie wskazuje się na brak czułych, łatwych w oznaczaniu i powszechnie dostępnych markerów laboratoryjnych dla wykrywania wczesnego uszkodzenia nerek o znaczeniu prognostycznym dla rozwoju AKI.

PATOMECHANIZM POWSTAWANIA I ROZWOJU OSTREGO USZKODZENIA NEREK

Ostre uszkodzenie nerek charakteryzuje gwałtowny spadek filtracji kłębuszkowej (GFR, *glomerular filtration rate*) oraz powolna i stała utrata najbardziej dotkniętych nefronów. Rozpoznanie AKI oznacza niewydolność nerek wtórną do funkcjonalnych i strukturalnych wewnątrznerkowych zmian w tym narządzie. Głównym powodem rozpoczęcia tych zmian

patologicznych w AKI jest ostra apoptoza komórek kanalików nerkowych. U około 80% pacjentów z AKI stwierdza się śmierć komórek kanalików, a nie ostre choroby kłębuszków lub miąższu. W praktyce klinicznej określenia AKI i ATN (*acute tubular necrosis*) są często używane jako synonimy, a AKI jest zastępowane niewłaściwym określeniem ATN. Unikanie terminu ATN ma swoje uzasadnienie, ponieważ potwierdzenie tego rozpoznania powinno się opierać na badaniu histopatologicznym, którego często nie można wykonać u ciężko chorych pacjentów [4, 5, 9, 12, 14].

W badaniach epidemiologicznych wykazano szerokie zróżnicowanie czynników etiologicznych i czynników ryzyka dla rozwoju AKI oraz ich powiązanie z przewlekłą chorobą nerek. Ostre uszkodzenie kanalików może być wynikiem niedotlenienia (wstrząs, rozległe zabiegi chirurgiczne na naczyniach głównych i sercu, transplantacja nerek) septycznego lub toksycznego uszkodzenia nerek (wywołanego radiokontrastem, środkami antybakteryjnymi, przeciwgrzybiczymi i cytotoksycznymi) [1, 4, 14–16].

IDEALNY MARKER DO DIAGNOZOWANIA OSTREGO USZKODZENIA NEREK

W ciągu ostatniej dekady zaprezentowano wiele nowych markerów oznaczanych we krwi i moczu do diagnozowania AKI. Markerom stawia się określone wymagania, których spełnienie jest warunkiem ich wykorzystania w badaniach klinicznych [2, 4, 11, 14, 16, 17].

Idealny marker do diagnozowania AKI powinien:

- wykazywać wysoką specyficzność narządową oraz zdolność do różnicowania wewnętrznego od przednerkowego i pozanerkowego AKI oraz od ostrego uszkodzenia kłębuszków nerkowych; w dotychczasowej praktyce klinicznej najlepszym dostępnym testem dla różnicowania wewnątrznerkowego AKI od uszkodzenia przednerkowego jest frakcja wydalania przesączonego sodu oraz ocena osadu moczu (w uszkodzeniu przednerkowym osad jest prawidłowy, w wewnątrznerkowym natomiast obecne są komórki nabłonka z kanalików i przewodów zbiorczych oraz wałeczki ziarniste, leukocytarne, woskowe);
- rozpoznawać etiologię AKI (niedotlenienie, działanie toksyn, sepsa lub ich połączenie);
- korelować z histopatologicznym obrazem biopatów nerek;

- wykrywać wczesne uszkodzenie oraz identyfikować zmiany patologiczne w różnych segmentach kanalików; biorąc pod uwagę, że patogenezą AKI dotyczy uszkodzenia w obrębie kanalików nerkowych, poszukiwania parametrów laboratoryjnych powinny się wiązać z identyfikacją zmian w ich obszarze;
- informować o rozpoczęciu i pogorszeniu uszkodzenia nerek — nie ma dotychczas dobrej metody dla odróżnienia łagodnej od średniej lub ostrej dysfunkcji nerek;
- charakteryzować się wysoką czułością dla ułatwienia wczesnego wykrycia niewielkich zmian funkcji nerek oraz ustaloną wartością progową dla oceny progresji i regresji uszkodzenia;
- cechować się nieinwazyjnością dla pacjenta;
- w badaniach laboratoryjnych powinien być oznaczany szybkimi, dokładnymi, tanimi, ogólnodostępnymi testami dla ułatwienia pomiarów w dużej liczbie próbek.

PARAMETRY DIAGNOSTYCZNE OSTREGO USZKODZENIA NEREK OZNACZANE WE KRWI

Tradycyjnymi, rutynowo wykorzystywanymi markerami laboratoryjnymi do wczesnego diagnozowania AKI są akumulowane we krwi końcowe produkty przemiany związków azotowych: azot mocznika we krwi (BUN, *blood urea nitrogen*) i kreatynina w surowicy. W praktyce klinicznej AKI wykrywa się za pomocą powiększającego się w krótkim okresie wzrostu stężenia **surowiczej kreatyniny**, który może być powiązany z oligurią lub nie [1, 2, 18].

Coraz więcej dowodów przedstawionych w piśmiennictwie świadczy jednak, że kreatynina nie jest markerem rozstrzygającym w diagnozowaniu AKI [1, 7, 10, 19, 20]:

- wzrost stężenia kreatyniny w surowicy nie jest wskaźnikiem specyficznym dla diagnozowania AKI i wymaga różnicowania od innych przednerkowych i pozanerkowych przyczyn wzrostu azotemii we krwi;
- kreatynina oznaczana w surowicy nie jest testem specyficznym dla diagnozowania uszkodzenia kanalików patogenetycznie powiązanego z rozwojem AKI, ale jest raczej efektem utraty funkcji filtracyjnej kłębuszków, towarzyszącej rozwijającej się AKI;
- wzrost stężenia kreatyniny w surowicy jest opóźniony w stosunku do aktualnie występujących zmian GFR i wymaga czasu do jej akumulacji i wyrównania stężenia przed wykryciem nieprawidłowej wartości;

- kreatynina oznaczana w surowicy jest słabym markerem dysfunkcji nerek — wahania stężenia tego parametru w surowicy nie są ani czułe, ani specyficzne w odpowiedzi na niewielkie zmiany GFR i są widoczne dopiero po 50-procentowej utracie zdolności funkcjonalnej nerek;
- na zmiany stężenia kreatyniny w surowicy mogą wpływać czynniki niezwiązane bezpośrednio z nerką, jak: wiek, płeć, masa ciała, stopień nawodnienia i sposób odżywiania chorego.

NGAL (*neutrophil-gelatinase associated lipocalin*) — lipokalina, 25 kD białko przyłączone kowalencyjnie do żelatynazy ludzkich neutrofilów. Oznaczone w surowicy wykazuje właściwości czułego, specyficznego wskaźnika predykcyjnego do oceny rozwoju wczesnych zmian w nerce w przebiegu AKI. Parametr ten oznaczany w surowicy wyznacza progresję AKI w następstwie zabiegów kardiologicznych, po podaniu radiokontrastu, a także u ciężko chorych dzieci z szokiem septycznym. We wczesnym okresie rozwoju ostrego uszkodzenia nerek NGAL akumuluje się w dwóch odrębnych pulach — w łożysku naczyniowym i w nerce. Na wzrost stężenia NGAL w surowicy krwi obok produkcji tego białka przez nerki prawdopodobny wpływ mają także komórki biorące udział w odpowiedzi immunologicznej (neutrofile, makrofagi) oraz spadek GFR w przebiegu AKI, przyczyniający się do spadku klirensu i nagromadzenia się tego białka w układzie sercowo-naczyniowym. Stężenie NGAL w surowicy większe niż 25 $\mu\text{g/l}$ świadczy o rozwoju AKI u dzieci [17, 21, 22].

Cystatyna C oznaczana w surowicy jest wcześniejszym od kreatyniny endogennym markerem funkcji nerek, zarówno dla rozpoznawania dysfunkcji, jak i identyfikacji zmian progresywnych w przebiegu choroby. Cystatyna C jest nieglikozylowanym białkiem, endogennym inhibitorem proteinaz cysteinowych, produkowanym i uwalnianym do krwi w stałym tempie przez wszystkie komórki jądrzaste. Stężenie cystatyny C w surowicy jest niezależne od wieku, płci, rasy, masy ciała, stanu nawodnienia i może być mierzone prostą metodą nefelometryczną. Stosunkowo wysokie stężenie w płynach ciała, niska masa (13,3 kDa) oraz dodatni ładunek cząsteczki tego białka ułatwiają jego swobodną filtrację kłębuszkową do moczu pierwotnego. W kanalikach proksymalnych jest ono całkowicie reabsorbowane i katabolizowane. Ze względu na stały stopień produkcji ocena stężenia cystatyny C w surowicy może być

▶▶NGAL, lipokalina — oznaczane w surowicy wykazuje właściwości czułego, specyficznego wskaźnika predykcyjnego do oceny rozwoju wczesnych zmian w nerce w przebiegu AKI◀◀

▶▶Cystatyna C oznaczana w surowicy jest wcześniejszym od kreatyniny endogennym markerem funkcji nerek, zarówno dla rozpoznawania dysfunkcji, jak i identyfikacji zmian progresywnych w przebiegu choroby◀◀

▶▶Rutynowo wykorzystywanymi markerami laboratoryjnymi do wczesnego diagnozowania AKI są akumulowane we krwi końcowe produkty przemiany związków azotowych: azot mocznika we krwi i kreatynina w surowicy◀◀

►►Kwas moczowy oznaczany w surowicy może być prostym markerem ostrości rozpoczynającego się uszkodzenia w rozwoju AKI◄◄

markerem filtracji kłębuszkowej, nieulegającym wpływowi infekcji, chorób wątroby i chorób zapalnych [2, 4, 23]. Za pomocą cystatyny C oznaczanej w surowicy wykrywa się dysfunkcję nerek u krytycznie chorych pacjentów z AKI (24–48 godz. wcześniej niż za pomocą kreatyniny). Nie jest to jednak parametr specyficzny diagnostycznie dla AKI, ponieważ jest raczej wczesnym markerem filtracji kłębuszkowej, a nie markerem uszkodzenia kanalików [4, 18].

Ostatnio zwraca się także uwagę na znaczenie diagnostyczne oznaczania **kwasu moczowego** we krwi dla wczesnego wykrywania i oceny rozwoju AKI. Chociaż wiele wiadomo o zależności między wzrostem stężenia kwasu moczowego we krwi a ostrym uszkodzeniem nerek (AUN, *acute urate nephropathy*), wzrost stężenia w surowicy tego parametru wykazano także w wielu innych typach AKI. Konsekwencją zwiększonej filtracji kłębuszkowej kwasu moczowego do moczu pierwotnego jest nadmierne wysycenie płynu wewnątrzkanalikowego tym składnikiem, jego krystalizacja, a w dalszej kolejności niedrożność światła kanalików i rozwój miejscowego stanu zapalnego z infiltracją komórek zapalnych. Biorąc pod uwagę, że wzrost stężenia kwasu moczowego w surowicy jest wypadkową wzrostu tworzenia (efektu wywołanego np. niedotlenieniem) i spadku ścieżki kłębuszkowej (obniżającego zdolność jego wydalania do moczu), uważa się, że kwas moczowy oznaczany w surowicy może być prostym markerem ostrości rozpoczynającego się uszkodzenia w rozwoju AKI.

Kwas moczowy oznaczany w surowicy jest nie tylko markerem diagnostycznym, ale także biologicznie aktywnym wskaźnikiem, bezpośrednio odpowiedzialnym za rozwój uszkodzenia nerek w przebiegu AKI przez: zwężenie naczyń nerkowych (hamowanie syntazy tlenu azotu, obniżenie stężenia tlenu azotu w komórkach nabłonka, stymulację układu renina-angiotensyna) oraz wpływ na zaburzenie funkcji nabłonka kanalików [hamowanie proliferacji i migracji komórek nabłonka, stymulację czynników prozapalnych — białko chemotaktyczne dla monocytów (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*) i białka C-reaktywnego (CRP, *C-reactive protein*)] [24, 25].

MOCZ JAKO MATERIAŁ KLINICZNY DO POSZUKIWANIA MARKERÓW OSTREGO USZKODZENIA NEREK

Badanie moczu jest tradycyjnym nieinwazyjnym sposobem diagnozowania, charaktery-

zowania przebiegu i prognozowania wielu chorób nerek. W ostatnim czasie oceniono przydatność nowych markerów laboratoryjnych oznaczanych w moczu do diagnozowania AKI. Część z tych parametrów (enzymy, białka) jest dobrze znana w rutynie laboratoryjnej, inne natomiast są wynikiem niedawno opublikowanych badań naukowych, poszukujących markerów specyficznie powiązanych z AKI. Najnowsze markery są efektem identyfikacji genów, które ulegają wczesnej indukcji po niedotlenieniu, uzyskanym w warunkach eksperymentalnych na hodowlach komórkowych lub w badaniach na zwierzętach. Rozwój technik biologii molekularnej powiązanych z analizą białkowych produktów genów (proteomiką) pozwala na szybką i rzetelną analizę tych białek w moczu, które są bezpośrednio związane z powstawaniem i rozwojem AKI [7, 11, 20].

Zadania stawiane parametrom oznaczanym w moczu dla diagnozowania AKI to:

- specyficzność diagnostyczna dla wykrywania uszkodzenia kanalików nerkowych;
- wczesne wykrywanie uszkodzenia nerek (z wyraźnym wyprzedzeniem w stosunku do wzrostu stężenia kreatyniny i BUN w surowicy);
- korelacja między stężeniem parametrów wykrywanych w moczu a ostrością choroby nerek;
- prognozowanie rozwoju choroby oraz niekorzystnych rokowań;
- ułatwienie szybkiej decyzji o doborze skutecznej terapii.

Proponowane w literaturze naukowej markery AKI oznaczane w moczu można sklasyfikować w 3 grupach:

- enzymy uwalniane z uszkodzonych komórek kanalików nerkowych i wydalone do moczu;
- białka nisko-cząsteczkowe (< 40 kD), których obecność w moczu świadczy o zaburzeniu ich zwrotnego wchłaniania z moczu pierwotnego przez komórki kanalików proksymalnych;
- białka specyficznie produkowane w nerce w AKI — efekty eksperymentalnych poszukiwań (na modelach komórkowych, zwierzęcych i u ludzi) z wykorzystaniem najnowszej technologii (genomika, proteomika) genów i ich produktów jako markerów AKI.

ENZYMY POCHODZENIA NERKOWEGO OBECNE W MOCZU

Dotychczas podjęto wiele prób praktycznego wykorzystania enzymów uwalnianych

z uszkodzonych komórek kanalików i wydalanych do moczu jako użytecznych markerów uszkodzenia nerek. Szczególną zaletą oznaczania enzymów kanalikowych obecnych w moczu jest ich indywidualna lokalizacja w wewnętrznej strukturze komórki (enzymy cytoplazmatyczne, lizosomalne, błonowe), która może dostarczyć szczegółowych informacji o naturze i rozmiarze uszkodzenia komórek kanalika proksymalnego, ocenie ich martwicy lub dysfunkcji [4, 5].

Fosfataza alkaliczna, gamma-glutamylotranspeptydaza i aminopeptydaza alaninowa są enzymami rąbka szczoteczkowego. Wzrost ich wydalania do moczu świadczy o uszkodzeniu błony rąbka szczoteczkowego z utratą struktury mikrokosmków [5]. Technicznym utrudnieniem oznaczania tych enzymów w moczu jest ich stosunkowo niska stabilność (do 4 godz. po zbiórce moczu) oraz konieczność usunięcia przed wykonaniem analizy substancji interferujących przez filtrację próbek moczu przez kolumny chromatograficzne.

Izoenzymy transferazy glutationowej (GST) są to enzymy cytoplazmatyczne: forma GST-alfa występuje w komórkach nabłonka kanalika proksymalnego, a forma GST-pi w kanaliku dystalnym. Zróżnicowany wzrost wydalania z moczem GST-alfa i GST-pi może wskazywać na lokalizację uszkodzenia w nefronie. U krytycznie chorych pacjentów z AKI wykazano wysoką czułość i specyficzność tych enzymów dla prognozowania niekorzystnego rozwoju choroby i potrzeby wprowadzenia terapii nerkowo-zastępczej. Prawidłowo przechowywane próbki moczu do oznaczania GST wymagają dodania środków stabilizujących aktywność enzymu [4, 5, 14, 26].

N-acetylo-β-D-glukozaminidaza (NAG) — najbardziej aktywna glikozydaza w lizosomach komórek nabłonka kanalika proksymalnego jest specyficznym markerem dla komórek kanalika nerkowego oznaczanym w moczu, ponieważ relatywnie duża masa cząsteczkowa (> 130 kDa) wyklucza filtrację tego enzymu przez kłębuszek. W przebiegu aktywnej choroby nerek obecność NAG w moczu jest stale podwyższona. Wzrost aktywności NAG w moczu wskazuje na uszkodzenie komórek kanalika, ale także może informować o wzroście aktywności lizosomalnej bez uszkodzenia tych komórek [4, 6].

Wydalenie enzymów z moczem jest bardzo czułym parametrem uszkodzenia kanalików nerkowych oraz wykazuje bezpośrednią korelację ze wzrostem stężenia kreatyniny

w surowicy i spadkiem GFR. Wzrost enzymurii występuje szybciej i jest bardziej czułym markerem diagnostycznym niż proteinuria kanalikowa, a także może być przydatny dla różnicowania czasu, jaki minął od momentu wystąpienia uszkodzenia (istotny wzrost aminopeptydazy alaninowej i CYR61 już pierwszego dnia po uszkodzeniu nerek obniża się w późniejszym okresie choroby wbrew utrzymującemu się uszkodzeniu). Mimo wyraźnego związku między rodzajami enzymów wydalanych z moczem a specyficzną lokalizacją uszkodzenia w komórkach nefronu, wartość predykcyjna tych parametrów dla przewidywania rozwoju AKI jest relatywnie słaba. Użyteczność enzymurii ogranicza zbyt niski próg czułości uwalniania enzymów kanalikowych, które wskazują na uszkodzenie komórek kanalika, ale bez określenia przyczyny i odwracalności tego procesu. Wydaje się, że wykorzystanie wysokoczułych enzymów kanalików nerkowych do wykrywania i monitorowania uszkodzenia nerek u pacjentów z AKI jest uzasadnione w najwcześniejszej fazie choroby, czyli w momencie przyjęcia na oddział lub do 4 dni przed wzrostem standardowych parametrów funkcji nerek we krwi. Badania te mogą identyfikować pacjentów z wysokim ryzykiem rozwoju AKI, pozwalając na wcześniejsze wprowadzenie terapii.

Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie NAG oznaczanego w moczu jako markera uszkodzenia nerek w przebiegu AKI. Podobnie jak inne enzymy pochodzenia kanalikowego, jest to zbyt czuły parametr do rozpoznawania AKI, chociaż utrzymującą się w dłuższym okresie wysoką aktywność NAG w moczu powiązano z gorszą prognozą rozwoju choroby i potrzebą leczenia nerkowo-zastępczego. Przykład tego enzymu nasuwa pytanie, czy zmiana progu czułości diagnostycznej dla innych enzymów może także wpłynąć na zmianę interpretacji ich obecności w moczu w przebiegu AKI.

Dla pomiarów aktywności enzymów w moczu stosuje się rutynowe, tanie i szeroko dostępne metody laboratoryjne, z wykorzystaniem specyficznych substratów dla każdego enzymu, a zmienność absorpcji produktów hydrolizy jest mierzona spektrofotometrycznie. Różnicowanie stężeń alfa- i pi GST w moczu wymaga natomiast metody ELISA. Szybka inaktywacja enzymów w moczu wymusza specjalne warunki zbiórki i przechowywania materiału przed przeprowadzeniem oznaczeń [4, 5, 14, 26].

►►Wydalenie enzymów z moczem jest bardzo czułym parametrem uszkodzenia kanalików nerkowych oraz wykazuje bezpośrednią korelację ze wzrostem stężenia kreatyniny w surowicy i spadkiem GFR◄◄

BIAŁKA SUROWICZE O NISKIEJ MASIE CZĄSTECzkOWEJ OZNACZANE W MOCZU

Białka o niskiej masie cząsteczkowej (< 40 kD), produkowane w różnych miejscach organizmu, ulegają swobodnej filtracji do moczu pierwotnego oraz całkowitej reabsorpcji przez komórki kanalików proksymalnych. Wzrost stężenia tych białek w moczu (proteinuria kanalikowa) może być praktycznym wskaźnikiem przedladowania komórek kanalików białkami lub ich uszkodzenia i dysfunkcji. Najlepiej scharakteryzowanymi białkami niskocząsteczkowymi dla wykrywania uszkodzenia kanalików proksymalnych są: alfa-1- i beta-2-mikroglobulina, białko wiążące retinol (RBP, *retinol-binding protein*), cystatyna C [4, 14, 20, 27].

Alfa-1-mikroglobulina (m. cząst. 31 kD) — białko syntetyzowane w wątrobie, powiązane z surowiczą immunoglobuliną A. Tylko wolne formy są filtrowane przez kłębuszek i reabsorbowane w komórkach kanalików proksymalnych.

Beta-2-mikroglobulina (m. cząst. 12 kD) — białko powiązane z antygenami zgodności tkankowej, swobodnie filtrowane w kłębuszku nerkowym do moczu pierwotnego. Technicznym utrudnieniem oznaczania beta-2-mikroglobuliny w moczu jest niestabilność tego parametru w pH mniejszym od 6, wymagająca alkalizacji zebranych próbek moczu (np. dwuwęglanem sodu). Wykazano wzrost stężenia beta-2-mikroglobuliny w moczu po niedotlenieniu wywołanym rozległymi operacjami kardiologicznymi lub transplantacją nerek, ale parametr ten słabo prognozował potrzebę terapii nerkowo-zastępczej.

Białko wiążące retinol (m. cząst. 21 kD) — białko częściowo przyłączone w osoczu do prealbumin, transportujące witaminę A, łatwo filtrowane w kłębuszku i prawie całkowicie reabsorbowane w kanaliku proksymalnym. Za ledwie niewielki spadek funkcji kanalików nerkowych może prowadzić do wzrostu wydalania tego białka w moczu. Przewagą RBP nad beta-2-mikroglobuliną jest stabilność tego białka w niskim pH.

Cystatyna C (m. cząst. 13 kD) — łatwo filtrowana przez kłębuszek, reabsorbowana i katabolizowana, ale niewydzielana przez kanalik. Przy sprawnej funkcji cewek nerkowych stężenie cystatyny C w moczu jest śladowe i niezależne od czynników nienerkowych, takich jak wiek i masa ciała. Z uwagi na brak zmian okołodobowych cystatynę C można oznaczać w pojedynczych próbkach moczu.

Stosunek stężeń cystatyny C do kreatyniny w moczu jest dobrym wskaźnikiem dysfunkcji kanalików nerkowych. W zaburzeniach funkcji kanalików nerkowych stężenie cystatyny C w moczu może wzrastać 200 razy. Wzrost wydalania cystatyny C w moczu pacjentów z AKI prognozuje niekorzystny rozwój AKI i potrzebę terapii nerkowo-zastępczej już w początkowej fazie choroby bez oligurii, stwarzając szansę na zabezpieczenie ochronne przed progresją choroby. W warunkach rutynowego przechowywania próbek moczu wykazano wysoką stabilność cystatyny C.

Przypuszcza się, że proteinuria kanalikowa przewyższa enzymurię zdolnością prognozowania terapii nerkowo-zastępczej w rozwoju AKI [14]. Metody oznaczania stężeń białek niskocząsteczkowych w moczu są tanie, specyficzne i rutynowo wykonywane.

MARKERY SPECYFICZNIE PRODUKOWANE W NERCIE W OSTRYM USZKODZENIU NEREK

Istnieją 3 grupy markerów laboratoryjnych oznaczanych w moczu, specyficznie powiązanych z AKI:

Produkty białkowe genów specyficznie powiązanych z ostrym uszkodzeniem nerek

W badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych na ludzkich komórkach hodowlanych kanalików proksymalnych oraz na zwierzętach stwierdzono geny, które ulegają wczesnej indukcji i wielokrotnemu zwiększeniu regulacji po niedotlenieniu. Produkty białkowe tych genów mogą służyć jako nowe markery dla oceny AKI. Należą do nich: CYR61, NGAL, KIM-1 [2, 12, 28–30].

CYR61 (*cysteine-rich protein 61*) — białko wydzielnicze bogate w cysteinę, przyłączające heparynę, członek rodziny pozakomórkowych czynników wzrostu. Działa lokalnie, ściśle przyłączone do komórki i macierzy pozakomórkowej jako cząsteczka sygnałowa zdolna do wypełniania wielu funkcji, odgrywa ochronną rolę w procesach reperacji i neowaskularyzacji.

W następstwie niedotlenienia nerki mRNA CYR61 ulega indukcji w komórkach kanalików proksymalnych, a białko CYR61 jest wydalane z moczem. W badaniach eksperymentalnych wzrost stężenia CYR61 w moczu pojawia się w okresie 3–6 godzin po 30-minutowym niedotlenieniu nerek, ze szczytem po 6–9 godzinach, utrzymywaniem się podwyższonego poziomu przez 24 godziny i w toku

▶▶ Za ledwie niewielki spadek funkcji kanalików nerkowych może prowadzić do wzrostu wydalania RBP ◀◀

dalszej obserwacji spadkiem, pomimo utrzymującego się uszkodzenia. Ze względu na szybką indukcję, stężenie CYR61 w moczu może być wczesnym markerem uszkodzenia nerek, pomocnym w ustaleniu skutecznej terapii ochronnej [4, 29, 31].

NGAL ulega ekspresji w bardzo niskich stężeniach w wielu ludzkich tkankach. Uszkodzenie nerki wywołane niedotlenieniem, sepsą lub nefrotoksynami silnie indukuje gen NGAL w nerce. Wzrost regulacji NGAL występuje w wielu segmentach nefronu, z akumulacją głównie w proliferujących komórkach kanałika proksymalnego. Rola biologiczna NGAL pozostaje niejasna. Sugeruje się efekt ochronny NGAL dla komórek kanałika narażonych na niedokrwienie, wynikający prawdopodobnie z udziału tego białka we wiązaniu, transporcie lub przechowywaniu kompleksów żelazowych. Biologicznym celem wzmożonej ekspresji tego białka w uszkodzonych komórkach kanałika w trakcie ich proliferacji jest prawdopodobnie indukcja ponownego powstawania nabłonka [4, 11, 27].

W badaniach eksperymentalnych stwierdzono wpływ intensywności i czasu trwania niedotlenienia nerki na wzrost stężenia NGAL w moczu. U ludzi wykazano wzrost ekspresji NGAL w nerce już po 2 godzinach od zabiegu kardiochirurgicznego, a wzrost stężenia tego parametru w moczu poprzedził wzrost stężenia kreatyniny w surowicy. U osób dorosłych z AKI wykazano 10-krotny wzrost stężenia NGAL w surowicy i więcej niż 100-krotny w moczu. Stężenia NGAL zarówno w osoczu, jak i w moczu korelowały ze stężeniem kreatyniny w surowicy. Obserwacje takie stwarzają podstawę do hipotezy, że stężenie NGAL w moczu jest czułym, specyficznym, wysoko przewidyującym, wczesnym markerem, odróżniającym ostrą przednerkową niewydolność nerek od AKI lub przewlekłej choroby nerek [2, 7, 12, 18, 28, 32, 33].

KIM-1 (*kidney injury molecule-1*) — niedawno wykryte białko pochodzenia kanałikowego. W zdrowej nerce KIM-1 nie jest wykrywalne, natomiast w warunkach eksperymentalnych, przy wykorzystaniu nowoczesnych technik biologii molekularnej, w białku tym rozpoznano, zarówno u zwierząt, jak i u ludzi, cechy markera niedotlenienia lub ostrego uszkodzenia komórek kanałika proksymalnego. KIM-1 jest typem 1. glikoproteiny transbłonowej z ektodomeną. Zewnątrzkomórkowa ektodomena KIM-1 odczepiona przez metaloproteinazy i wydalona do moczu jest ilościowym markerem AKI. Niejasny jest pa-

tomechanizm i czynniki odpowiedzialne za regulację złuszczenia tego fragmentu KIM-1 do moczu. Wzrost ekspresji i wzmożonej syntezy KIM-1 występuje głównie w obszarach uszkodzenia kanałikowo-mięsżowego z zapaleniem i włóknieniem. W czasie ostrej proteinurii indukcja KIM-1 w kanałiku wzrasta. Wzmożona ekspresja tego białka może być zatem konsekwencją uszkodzenia kanałikowo-mięsżowego. Z drugiej strony dzięki zdolności do interakcji z innymi białkami może ono aktywnie modulować procesy związane z uszkodzeniem lub naprawą.

Wykazano przynajmniej 5-krotny wzrost KIM-1 w moczu już 1. dnia po toksycznym uszkodzeniu kanałików nerkowych, podczas gdy BUN i kreatynina w osoczu wzrosły dopiero w 3. dniu. Znaczny wzrost wydalania KIM-1 z moczem występuje już kilka godzin po wykonaniu zabiegów kardiochirurgicznych. Wysokie stężenie KIM-1 w moczu przemawia za złym rokowaniem u chorych z ostrą niewydolnością nerek. Wzrost wydalania KIM-1 z moczem jest bardziej swoisty dla niedokrwienego uszkodzenia nerek i praktycznie niezależny od rodzaju przewlekłej choroby nerek lub zakażenia dróg moczowych.

Ektodomena KIM-1 w moczu jest obiecującym, czułym i specyficznym markerem AKI u ludzi, w minimalnym stopniu zależnym od właściwości fizykochemicznych moczu i innych składników w nim zawartych [2, 4, 11, 16, 30, 34, 35].

Cytokiny i chemokiny

W patogenezie AKI wywołanej niedotlenieniem nerek kluczową rolę odgrywają zapalenie i odpowiedź immunologiczna, nieodłączna wymagająca wzrostu tworzenia w nerce mRNA oraz odpowiadających im białek prozapalnych chemokin i cytokin. W większości badań cytokiny oznaczają się w surowicy lub osoczu, chociaż oznaczenie ich w moczu może być prostszą i łatwiejszą alternatywą. Niejasna jest rola prognostyczna cytokin oznaczanych w moczu, w różnych etapach choroby oraz w przepowiadaniu śmiertelności pacjentów w stanach krytycznych. Są to parametry niespecyficzne, wzrastają także w sepsie, w chorobach wątroby lub płuc, gdy nie stwierdza się uszkodzenia nerek. Spośród cytokin oznaczanych w moczu, powiązanych z diagnozowaniem AKI, podkreśla się znaczenie IL-6, IL-8, Gro- α i IL-18 [11, 20].

Gro- α — jest ludzkim analogiem mysiej chemokiny KC (*keratinocyte-derived chemoki-*

►► Spośród cytokin oznaczanych w moczu, powiązanych z diagnozowaniem AKI, podkreśla się znaczenie IL-6, IL-8, Gro- α i IL-18◀◀

ne). W eksperymentalnie wywołanym uszkodzeniu nerek wzrost stężenia KC w surowicy i moczu myszy występował najwcześniej i utrzymywał się najdłużej spośród 18 wybranych cytokin i chemokin. Stężenia KC w surowicy i w moczu były najwyższe po 3 godzinach po niedotlenieniu, podczas gdy zmiany histologiczne były wyraźne już po godzinie, a kreatynina w surowicy wzrastała dopiero 24 godziny po niedotlenieniu.

Stężenie Gro- α w moczu istotnie wzrosło u tych chorych po transplantacji nerek, którzy wymagali dializy w porównaniu z osobami z dobrą funkcją przeszczepu. Uważa się, że oznaczanie Gro- α w moczu może być markerem dla wczesnej diagnozy i prognozowania rozwoju AKI wywołanego niedotlenieniem [17].

Interleukina 18 (IL-18) — cytokina prozapalna, wzrasta w endogennych procesach zapalnych, odgrywa ważną rolę w patofizjologii sepsy, może działać jako atraktant dla neutrofilów, jest mediatorem zapalenia i uszkodzenia tkanek wywołanych niedotlenieniem w wielu organach. W badaniach eksperymentalnych na zwierzętach, z wywołaną niedotlenieniem ostrą martwicą kanalików, stwierdzono, że wewnątrzkomórkowa IL-18 aktywowana za pośrednictwem kaspazy-1 odpowiada za uszkodzenie nerek w przebiegu AKI, niezależnie od roli neutrofilów. Źródłem kaspazy-1 i IL-18 w AKI z niedotlenienia są komórki kanalików proksymalnych [2, 4, 36, 37].

Interleukina 18 oznaczana w moczu jest wczesnym, szybkim, rzetelnym, dokładnym i niedrogim testem dla wykrywania wczesnego uszkodzenia nerek spowodowanego niedokrwieniem lub nefrotoksynami, pozwala wykluczyć azotemię przednerkową, przewlekłe choroby nerek i zakażenie dróg moczowych, wykazuje właściwości predykcyjne niekorzystnego rozwoju choroby i prawdopodobieństwa zgonu u krytycznie chorych pacjentów bez sepsy. Czułość i specyficzność oznaczania IL-18 w moczu dla diagnozowania AKI u ludzi wynosi > 90%. Wzrost stężenia IL-18 w moczu heterogenicznej populacji krytycznie chorych dorosłych i u dzieci po zabiegu kardiochirurgicznym wystąpił 24–48 godzin przed rozpoznaniem AKI definiowanej według kryteriów RIFLE i był powiązany z pogarszaniem się ostrości AKI [2, 18, 38, 39].

Białka strukturalne i funkcjonalne kanalików nerkowych

Ważną przyczyną strukturalnego, biochemicznego i funkcjonalnego uszkodzenia komórek

kanalika proksymalnego w AKI jest depolimeryzacja aktyny. O uszkodzeniu kanalika w przebiegu AKI świadczy także wzrost wydalania do moczu transporterów sodu rozmieszczonych wzdłuż nefronu, głównie NHE3 [4, 20].

F-aktyna — jest zawarta w mikrokosmkach szczytowej części komórek proksymalnego kanalika nerkowego. Obszar ten jest wyjątkowo wrażliwy na niedotlenienie, reagując szybkimi (w ciągu 5 min), zależnymi od czasu niedotlenienia zmianami strukturalnymi, wynikającymi z depolimeryzacji aktyny zawartej w mikrokosmkach. Za regulację dynamiki rozzerwania aktyny odpowiada czynnik depolimeryzujący aktynę (ADF, *actin depolymerizing factor*), 19-kDa ufosforylowane białko przyłączające aktynę. Proces defosforylacji ADF, zależny od spadku pH, aktywuje to białko, które w dalszej kolejności odpowiada za przyłączenie, depolimeryzację i odłączenie F-aktyny w szczytowej części komórki, będąc przyczyną destrukcji mikrokosmków.

Niedotlenienie jest przyczyną spadku pH z uogólnioną defosforylacją białek. W warunkach fizjologicznych w moczu nie wykrywa się obecności ani ADF ani aktyny, natomiast po 30 minutach niedotlenienia próbki moczu zawierają obydwa te parametry [40].

Izoforma 3 wymiennika sodowo-wodowego (NHE-3, *sodium-hydrogen antiporter 3*) — najliczniejszy transporter sodu w kanalikach nerkowych, umiejscowiony w błonie szczytowej i podszczytowych endosomach komórek kanalika proksymalnego nerek, odpowiedzialny za 60–70% reabsorpcji filtrowanego sodu i dwuwęglanów. Na podstawie obserwacji spadku reabsorpcji sodu w kanaliku nerkowym w przebiegu AKI przypuszcza się, że profil transporterów sodu rozmieszczonych wzdłuż nefronu może być użytecznym parametrem oznaczanym w moczu do wykrywania i klasyfikacji AKI. Izoforma 3 wymiennika sodowo-wodorowego odgrywa główną rolę w absorpcji zwrotnej jonów sodu. Spadek ekspresji NHE3 w nerce oraz istotna korelacja między wzrostem stężenia NHE3 w moczu i klinicznymi parametrami AKI w eksperymentalnej ostrej martwicy kanalików dały podstawę do domniemania o utracie tego transportera sodu do moczu. Wzrost wydalania NHE3 z moczem może pełnić funkcję specyficznego markera ostrego uszkodzenia kanalików, a także odróżniającego AKI od innych chorób nerek i uszkodzenia przednerkowego [4, 11].

Niedawno wykryte białka-markery AKI w moczu są głównie efektem poszukiwań eks-

►►Przypuszcza się, że profil transporterów sodu rozmieszczonych wzdłuż nefronu może być użytecznym parametrem oznaczanym w moczu do wykrywania i klasyfikacji AKI◄◄

perymentalnych i badań naukowych. Laboratoryjne oznaczanie tych parametrów wymaga czułych, specyficznych i stosunkowo kosztownych metod immunologicznych. Parametry te zanim zostaną praktycznie wykorzystane, będą poddane licznym procesom walidacji. Z praktycznego punktu widzenia wyjaśnienia wymagają standardy dotyczące zbiórki i przechowywania próbek moczu do oznaczenia tych parametrów. Podkreśla się znaczenie szybkiego odwirowania moczu po pobraniu, dodanie do supernatantu komercyjnie dostępnych inhibitorów proteaz serynowych oraz zamrożenie próbek w -80°C do czasu wykonania oznaczeń [6].

ZASADY DOBORU PARAMETRÓW AKI OZNACZANYCH W SUROWICY I W MOCZU

Uwzględniając zróżnicowaną strukturę i funkcję układu naczyniowego, tkanki śródmiąższowej nerek, kłębuszków i poszczególnych odcinków cewek nerkowych, powszechna staje się opinia, że nie ma możliwości, aby pojedynczy marker mógł monitorować różne miejsca anatomiczne oraz ostrość i kolejne etapy uszkodzenia nerek w przebiegu AKI. Zamiast poszukiwania jednego parametru, coraz częściej wskazuje się na koncepcję ustalenia ich panelu diagnostycznego, składającego się z specyficznych białek dla poszczególnych segmentów nefronu, różniących się źródłem pochodzenia, ekspresją w nerce, stężeniem w moczu, czułością i specyficznością diagnozowania funkcji kanalików nerkowych oraz trudnością i kosztem ich laboratoryjnego oznaczania.

Utworzone panele mogą mieć zastosowanie w [4, 11, 14, 16, 28, 29]:

- rozróżnianiu typów i etiologii AKI;
- odróżnieniu łagodnej od średniej lub ostrej postaci AKI;
- określeniu terminu zainicjowania uszkodzenia nerek, czasu trwania AKI oraz przewidywaniu regresji uszkodzenia nerek.

Dane z piśmiennictwa wskazują na najbardziej obiecujące panele markerów oznaczanych w surowicy i w moczu [6, 18, 41, 42]:

- dla różnicowania oraz wczesnego diagnozowania AKI:

- wzrost stężenia cystatyny C w surowicy oraz IL-18, cystatyny C i KIM-1 w moczu,
- wzrost stężenia cystatyny C w surowicy oraz IL-18, NGAL, glutationu-s-transferazy pi (GSTpi, *glutathione S-Transferase pi*) w moczu;

- dla prognozowania utrzymywania się AKI:

- wzrost stężenia aktywności, IL-6, IL-8 w moczu,
- wzrost stężenia aktywności, IL-6, IL-8 i aktywności GGTP w moczu;

- dla oceny ostrości przebiegu AKI:

- wzrost aktywności NAG i stężenia KIM-1 w moczu;

- dla prognozowania śmiertelności w przebiegu AKI:

- wzrost stężenia KIM-1 i IL-18 oraz aktywności NAG w moczu.

Podsumowując, należy stwierdzić, że AKI stanowi problem w medycynie klinicznej i cechuje się wysokim wskaźnikiem zachorowalności i śmiertelności. Dotychczasowa diagnostyka laboratoryjna AKI, opierająca się na oznaczaniu stężenia kreatyniny w surowicy, okazała się niedoskonała i niewystarczająca. Mimo intensywnych poszukiwań, nie znaleziono dotychczas jednego idealnego markera do diagnozowania AKI. Zaprezentowane nowe białka oznaczane w moczu są wyraźnym postępem w zakresie wiedzy i praktycznego postępowania na oddziałach nefrologii i intensywnej opieki medycznej i są znakomitymi kandydatami na markery przydatne w rozpoznawaniu, prognozowaniu rozwoju choroby i postępowania terapeutycznego w AKI. Na obecnym etapie wymagają one jednak walidacji i oznaczeń w licznych populacjach pacjentów.

►►Mimo intensywnych poszukiwań, nie znaleziono dotychczas jednego idealnego markera do diagnozowania AKI◀◀

STRESZCZENIE

Ostre uszkodzenie nerek (AKI) jest chorobą o wysokim stopniu zachorowalności i śmiertelności, dotyczącą ciężko chorych pacjentów. W dotychczasowej diagnostyce laboratoryjnej brakuje czułych i łatwych dla praktyki klinicznej markerów laboratoryjnych dla wykrywania wczesnego uszkodzenia nerek o znaczeniu prognozującym stopniowy rozwój AKI.

W pracy przedstawiono nowych kandydatów na biochemiczne markery laboratoryjne, przyczynowo powiązane z patomechanizmem powstawania i rozwoju AKI, oraz przeanalizowano możliwość ich oznaczania w surowicy i w moczu. Część z nich jest dobrze znana, chociaż niewykorzystywana w praktyce laboratoryjnej, inne natomiast są wynikiem współczesnych doświadczeń eksperymentalnych, wymagających walidacji i badań klinicznych. Aktualna identyfikacja i klasyfikacja AKI opiera się głównie na obserwacji stopniowego wzrostu stężenia kreatyniny w surowicy, mimo że parametr ten dostarcza opóźnionych i niezręcznych informacji w stosunku do rzeczywiście toczących się zmian patologicznych w nerce. Najbardziej obiecującymi parametrami AKI oznaczanymi

w surowicy są cystatyna C, NGAL i kwas moczowy. Wśród markerów AKI oznaczanych w moczu wyróżnia się enzymy uwalniane z uszkodzonych komórek kanalików (fosfataza alkaliczna, gamma glutamylotranspeptydaza, aminopeptydaza alaninowa, izoenzymy transferazy glutationowej, N-acetylo- β -D-glukozaminidaza), niskocząsteczkowe białka osocza (alfa-1-mikroglobulina, beta-2-mikroglobulina, białko wiążące retinol, cystatyna C) oraz białka produkowane w nerce specyficznie powiązane z rozwojem AKI: CYR-61, NGAL, KIM-1, cytokiny i chemokiny (Gro- α , IL-18) oraz strukturalne i funkcjonalne białka kanalików nerkowych (F-aktyna, izoforma-3 wymiennika sodowo-wodorowego).

Opierając się na różnicach ekspresji wymienionych markerów, uzyskanie ich panelu oznaczanego w surowicy i w moczu może być pomocne dla różnicowania przyczyn rozwoju AKI, ustalenia czasu trwania, ostrości uszkodzenia nerek, prognozowania rozwoju choroby oraz monitorowania odpowiedzi na wprowadzone leczenie.

Forum Nefrologiczne 2010, tom 3, nr 2, 71–81

Słowa kluczowe: ostre uszkodzenie nerek, cystatyna C, NAG, NGAL, IL-18, KIM-1

Piśmiennictwo

- Schrier R.W., Wang W., Poole B., Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J. Clin. Invest.* 2004; 114: 5–14.
- Venkataraman R., Kellum J.A. Defining acute renal failure: the RIFLE criteria. *J. Intensive Care Med.* 2007; 22: 187–193.
- Izzedine H., Baumelou A., Deray G. Acute renal failure in HIV patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007; 22: 2757–2762.
- Trof R.J., Di Maggio F., Leemreis J., Groeneveld A.B.J. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock* 2006; 26: 245–253.
- Westhuyzen J., Endre Z.H., Reece G., Reith D.M., Saltissi D., Morgan T.J. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant* 2003; 18: 543–551.
- Liangos O., Perianayagam M.C., Vaidya V.S. i wsp. Urinary N-acetyl- β -(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18: 904–912.
- Nguyen M.T., Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr. Nephrol.* 2008; 23: 2151–2157.
- Akcan-Arikan A., Zappitelli M., Loftis L.L., Washburn K.K., Jefferson L.S., Goldstein S.L. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int.* 2007; 71: 1028–1035.
- Soni S.S., Ronco C., Katz N., Cruz D.N. Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood Purif.* 2009; 28: 165–174.
- Bagshaw S.M., George C., Dinu I., Bellomo R. A multi-centre evaluation of the Rife criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008; 23: 1203–1210.
- Rabb H. Novel urinary markers for early diagnosis of ARF. *Am. J. Kid. Dis.* 2003; 42: 599–600.
- Mishra J., Mori K., Ma Q. i wsp. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15: 3073–3082.
- Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif.* 2010; 29: 357–365.
- Herget-Rosenthal S., Poppen D., Hüsing J. i wsp. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin. Chem.* 2004; 50: 552–558.
- Becherucci F., Mazzinghi B., Ronconi E. i wsp. The role of endothelial progenitor cells in acute kidney injury. *Blood Purif.* 2009; 27: 261–270.
- Vaidya V.S., Ramirez V., Ichimura T., Bobadilla N.A., Bonventre J.V. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006; 290: F517–F529.
- Molls R.R., Savransky V., Liu M. i wsp. Keratinocyte-derived chemokine is an early biomarker of ischemic acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2006; 290: F1187–F1193.
- Dent C.L., Ma Q., Dastrala S. i wsp. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery:

- a prospective uncontrolled cohort study. *Crit. Care* 2007; 11: R127.
19. Coca S.G., Yalavarthy R., Concato J., Parikh C.R. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: systematic review. *Kidney Int.* 2008; 73: 1008–1016.
 20. Bonventre J.V. Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers. *Contrib. Nephrol.* 2007; 156: 213–219.
 21. Ricci Z., Ronco C. Today's approach to the critically ill patient with acute kidney injury. *Blood Purif.* 2009; 27: 127–134.
 22. Wheeler D.S., Devarajan P., Ma Q. i wsp. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit. Care Med.* 2008; 36: 1297–1303.
 23. Royakkers A.A., vanSuijlen J.D., Hofstra L.S. i wsp. Serum cystatin C — a useful endogenous marker of renal function in intensive care unit patients at risk for or with acute renal failure? *Curr. Med. Chem.* 2007; 14: 2314–2317.
 24. Ejaz A.A., Mu W., Kang D.H. i wsp. Could uric acid have a role in acute renal failure? *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 2: 16–21.
 25. Nakagawa T., Mazzali M., Kang D.H., Sánchez-Lozada L.G., Acosta J.H., Johnson R.J. Uric acid — a uremic toxin? *Blood Purif.* 2006; 24: 67–70.
 26. Branten A.J.W., Mulder T.P.J., Peters W.H.M., Assmann K.J.M., Wetzels J.F.M. Urinary excretion of glutathione S transferases alpha and pi in patients with proteinuria: reflection of the site of tubular injury. *Nephron* 2000; 85: 120–126.
 27. Uchida K., Gotoh A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin. Chim. Acta* 2002; 323: 121–128.
 28. Mishra J., Ma Q., Prada A. i wsp. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: 2534–2543.
 29. Muramatsu Y., Tsujie M., Kohda Y. i wsp. Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney Int.* 2002; 62: 1601–1610.
 30. Han W.K., Bailly V., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre J.V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002; 62: 237–244.
 31. Ferguson S.M. CYR61 as a marker for acute renal failure. *Federal Register* 2003; 68: 18660.
 32. Mishra J., Dent C., Tarabishi R. i wsp. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *The Lancet* 2005; 365: 1231–1238.
 33. Bolignano D., Coppolino G., Campo S. i wsp. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol. Dial. Transplant* 2008; 23: 414–416.
 34. Timmeren M.M., Bakker S.J.L., Vaidya V.S. i wsp. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2006; 291: F456–F464.
 35. Zhang Z., Humphreys B.D., Bonventre J.V. Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18: 2704–2714.
 36. Edelstein C.L., Hoke T.S., Somerset H. i wsp. Proximal tubules from caspase-1-deficient mice are protected against hypoxia-induced membrane injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007; 22: 1052–1061.
 37. Melnikov V.Y., Ecder T., Fantuzzi G. i wsp. Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic renal failure. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 1145–1152.
 38. Parikh C.R., Abraham E., Ancukiewicz M., Edelstein C.L. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16: 3046–3052.
 39. Washburn K.K., Zappitelli M., Arian A.A. i wsp. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008; 23: 566–572.
 40. Schwartz N., Hosford M., Sandoval R.M. i wsp. Ischemia activates actin depolymerizing factor: role in proximal tubule microvillar actin alterations. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 1999; 276: F544–F551.
 41. Kwon O., Molitoris B.A., Pescovitz M., Kelly K.J. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained arf after ischemic injury in renal allografts. *Am. J. Kid. Dis.* 2003; 41: 1074–1087.
 42. Devarajan P. Emerging biomarkers of acute kidney injury. Ronco C., Bellomo R., Kellum J.A. (red.). *Acute Kidney Injury.* *Contrib. Nephrol. Basel Karger.* 2007; 156: 203–212.