

© Фоміна С. П., Багдасарова І. В., Мигаль Л. Я., 2013

УДК 616.611-002-008.6-053.2

**С. П. ФОМІНА, І. В. БАГДАСАРОВА, Л. Я. МИГАЛЬ**

**ПРОГНОЗУВАННЯ НЕСПРИЯТЛИВОГО ПЕРЕБІГУ ГЛОМЕУРЛОНЕФРИТУ З  
НЕФРОТИЧНИМ СИНДРОМОМ У ДІТЕЙ: ЕНЗИМУРИЧНІ МАРКЕРИ**

*FOMINA S. P., BAGDASAROVA I. V., MIGAL L. A.*

**PREDICTION OF UNFAVORABLE COURSE OF GLOMERULONEPHRITIS WITH NEPHROTIC  
SYNDROME IN CHILDREN: ENZYMURIC CRITERIA**

Державна установа “Інститут нефрології НАМН України”  
*SI «Institute of Nephrology NAMS of Ukraine»*

**Ключові слова:** нефротичний синдром, біологічні маркери, *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-глюкозамінідаза,  $\beta$ -галактозидаза, прогноз, відношення правдоподібності.

**Фоміна Світлана Петрівна**  
**e-mail: sfomina@meta.ua**

**Key words:** nephrotic syndrome, biomarkers, *N*-acethyl- $\beta$ -*D*-glucosaminidase,  $\beta$ -galactosidase, prognosis, likelihood ratio.

**Резюме.** Цель исследования – изучение возможности использования определения активности реноспецифических ферментов мочи у детей с гломерулонефритом, нефротическим синдромом (НС), в качестве биомаркеров прогнозирования неблагоприятного течения заболевания. Материалы и методы. У 209 детей, больных гломерулонефритом с НС, на разных этапах наблюдения в зависимости от течения заболевания рассчитаны операционные характеристики показателей, полученных при определении активности реноспецифических ферментов – N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (НАГ) и β-галактозидазы (β-Гал). Результаты. Повышение активности НАГ и β-Гал мочи свидетельствует об активном включении в патологический процесс при НС тубулярного аппарата почек. Вероятность прогрессирования НС повышается при сохранении активности НАГ >50 ЕД и β-Гал >30 ЕД на 8-10 неделе лечения и в катамнезе (через 1.5-3 года после отмены терапии), повышении уровня ферментов на 6-9 месяце поддерживающей терапии (НАГ >100 ЕД, β-Гал >60 ЕД). Изменение активности ферментов до начала терапии не несет прогностической нагрузки. На основании полученных данных создан энзимурический фрагмент системы мультимаркерного параллельного каскадного прогнозирования неблагоприятного течения заболевания. Заключение. Активность реноспецифических ферментов мочи (НАГ и β-Гал) целесообразно использовать в качестве маркеров прогрессирования ГН с НС у детей с учетом оптимальных сроков проведения исследований и диапазонов показателей, обобщенных в предложенной системе прогнозирования.

**Summary.** The aim of study was to investigate the possibility of using the detection of urine renospecific enzymes activity in children with nephrotic syndrome (NS) as biomarkers of unfavorable disease course prognosis. Materials and methods. The operating characteristics of urine activity values of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) and β-galactosidase (β-Gal) were estimated in 209 nephrotic children depending on disease course. Results. The high activity of NAG and β-Gal confirms the active participation of renal tubules in pathological process in NS. Likelihood of NS progression increased while saving NAG activity >50 Units and β-Gal >30 Units in 8-10 weeks of therapy and at 1.5-3 years of follow-up after treatment withdrawal; increasing of enzymes levels in 6-9 months on tapering treatment period (NAG >100 Units, β-Gal >60 Units). Changing the enzymes activity in the disease active stage before treatment does not have the prognostic defense. The enzymuric fragment of multimarker parallel cascade system for prediction unfavorable NS course has been created. Conclusion. Urine renospecific enzymes activity (NAG and β-Gal) should be used as markers of the progression in NS children with the optimal terms studies and range parameters as summarized in the proposed prediction system.

**ВСТУП.** Особливе місце серед хвороб органів сечової системи займає гломерулонефрит з нефротичним синдромом (ГН з НС), який має неоднозначний прогноз і потребує тривалого імунотропного лікування. Прогнозування перебігу і наслідків ГН базується на значній кількості методик і тестів. Однак варіабельність клінічної ситуації та необхідності повторення досліджень в динаміці для встановлення вектору (напрямку) змін, який визначає прогноз, ускладнюють інтерпретацію результатів. Крім того, в клінічній практиці часто відбувається заміщення (ототожнення) прогностичних маркерів на маркери стану, які оцінюють важкість захворювання, але не мають прямого прогностичного навантаження. Наявність чи перевага у пацієнта тих чи інших ознак (проявів, патернів) віддзеркалює в цих випадках певний етап хвороби, але не можливий розвиток подій надалі. Прогностичні ж маркери дають змогу оцінити не тільки прогноз захворювання, а й відповідь на лікування, сприяють моніторингу ефективності терапії.

В рамках доказової медицини параметри, вибрані в якості оптимальних маркерів прогнозу, мусять мати підтверджений зв'язок з клінічними наслідками захворювання, тобто відповідати вимогам сурогатних (третинних) точок аналізу. Методики по їх визначенню повинні характеризуватися високою точністю, надійністю, відтворюваністю, мати відповідні операційні характеристики (специфічність та чутливість) [2]. Слід

враховувати, що більшість процесів і механізмів їх розвитку в клінічній нефрології багатofакторні, встановити ступінь зв'язку і взагалі наявність відносин між якимись двома ознаками остаточно на сучасному етапі практично не можливо, але не висока специфічність методу (60-70%) не зменшує ваги асоціації [9, 12]. Реальну цінність тесту в цьому випадку для конкретного хворого несе розрахунок ВП (відношення правдоподібності - likelihood ratio) [9, 10]. Залежно від поставленої мети цей показник свідчить про ризик наявності (відсутності) захворювання. В клінічній медицині є сенс використовувати не тільки загальні опції (хвора чи здорова людина), а й приватні випадки – можливість прогресування захворювання чи її відсутність, вірогідність повної ремісії чи несприятливий перебіг хвороби. В такому разі при ВП позитивного результату (ВП+) 2.00 вірогідність (ризик) прогресування захворювання буде вдвічі вище у суб'єкта з наявністю ознаки, ніж без неї. Якщо ВП+ 1.00, то досліджуваний фактор не має прогностичної ваги. ВП негативного результату (ВП-) несе зворотне навантаження – відсутність ознаки збільшує ризик розвитку події. Найбільш корисними для клініциста є тести з ВП ≥5.00, а ВП ≥10.00 дає надію розглядати результат дослідження як безперечний закон.

Окрім уповільнення ШКФ (еталонного маркеру прогресування при будь-якій патології нирок), при ГН з НС визнана важливість дослі-

дження таких параметрів як мікроальбумінурія, протеїнурія, рівень  $\beta 2$ -мікроглобуліну, реноспецифічних ферментів сечі, тощо [7, 8, 11]. Відомо, що при виникненні і прогресуванні патологічного процесу в нирках активність ферментів сечі посилюється за рахунок викиду із зруйнованих лізосом гідролітичних ензимів. Активність N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази (НАГ) та  $\beta$ -галактозидази ( $\beta$ -Гал) розцінюють як інформативні та чутливі маркери стану тубулярного апарату, його проксимальних каналців [3, 7]. Дослідники розглядають зазначені ферменти і в якості маркерів прогнозу, однак без опрацювання їх зв'язку з вторинними (прогресування, ремісія) чи первинними (виживання) кінцевими точками аналізу з точки зору доказової медицини (з розрахунком операційних характеристик і ВП зокрема). Мета дослідження – вивчення можливості використання визначення активності реноспецифічних ферментів у дітей, хворих на ГН з НС, в якості маркерів прогнозування несприятливого перебігу захворювання.

#### ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Дизайн дослідження – одномоментне (cross-sectional study), об'єкт – 209 дитини віком від 2 до 17-ти років, хворих на ГН з НС. Діагноз встановлено за наявності класичного симптомокомплексу захворювання (протеїнурія  $>3$  г/доба або 1 г/м<sup>2</sup> для молодшої вікової групи, гіпоальбумінемія  $<25$  г/л, гіперхолестеринемія  $>6.5$  ммоль/л, набряки). Пацієнти отримали комбіновану імунотропну терапію згідно протоколу – індукція ремісії за допомогою глюкокортикостероїдів та тривале (до 12 місяців) призначення імуносупресантів [1, 4]. Стан хворих оцінено на різних етапах: в періоді розгорнутих клінічних проявів до призначення лікування (до лікування), в кінці застосування максимальних доз препаратів (8–10 тижнів), на підтримуючій терапії (6–9 місяців) та після завершення лікування через 1.5–3 роки (катамнез). Залежно від наслідків захворювання (аналіз проведено через 3–5 років після завершення лікування) ретроспективно виділено групи зі сприятли-

вим перебігом (ремісія) та прогресуванням (збереження активності НС без або з уповільненням швидкості клубочкової фільтрації).

Комплекс обстеження, окрім загальноприйнятих методик, включав визначення активності НАГ і  $\beta$ -Гал за методом Покровського О. О. (1971), адаптованого нами для сечі [3]. Отримана в результаті дослідження величина ензимурії (в мкмольх пара-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години) перераховувалася на 1 ммоль креатиніну сечі, що дозволило зменшити вплив діурезу на остаточний результат. Для полегшення сприйняття матеріалу надалі в роботі одиниці виміру активності реноспецифічних ферментів (мкмоль/год/ммоль креатиніну) представлено як ОД.

До контрольної групи (група порівняння) було включено 28 практично здорових дітей відповідного віку, без патології нирок із швидкістю клубочкової фільтрації за Шварцем  $>90$  мл/хв./м<sup>2</sup>.

Клініко-лабораторне обстеження хворих на етапах лікування та спостереження виконано у відділенні нефрології ДКЛ №7 м. Києва (клінічна база відділу дитячої нефрології ДУ «ІН НАМН»), ензимуричні дослідження – в лабораторії біохімії ДУ «ІН НАМН» (завідувач – к. біол. н. Л. В. Король).

Матеріал опрацьовано з використанням методів варіаційної статистики (SigmaPlot 2000 for Windows Version 6.00, 1986–2000 SPSS Inc.). Дані для кількісних перемінних представлено як медіана/25;75 перцентилі.

Для розрахунку операційних характеристик тестів на визначення активності ензимів у їх зв'язку з прогресуванням захворювання створено чотирипільні таблиці (“2x2”) для подальшого використання в он-лайн калькуляторі [10]. Особливістю формування таблиць стало уточнення станів (наявність чи відсутність захворювання) та результату тесту (позитивний чи негативний (табл. 1).

Таблиця 1

#### Приклад побудови таблиці “2x2” для розрахунку операційних характеристик діагностичного тесту для прогнозування перебігу захворювання

Пацієнти з	Прогресуванням захворювання	Відсутністю прогресування (ремісією)
Високим значенням досліджуваного показника	тест»+» захворювання»+» А	«тест»+» захворювання»-» Б
Низьким значенням досліджуваного показника	тест»-» захворювання»+» В	тест»-» захворювання»-» Г

При створенні таблиць ми прирівнювали “наявність захворювання” – його прогресуванню, “відсутність захворювання” – досягненню ремісії. “Тест позитивний” чи “тест негативний” залежало від розташування значення досліджу-

ваної величини вище або нижче запропонованої межі. В представленій роботі для розрахунку вірогідності прогресування ГН з НС використано інтервали НАГ:  $>17$ ,  $>50$ ,  $>100$  ОД;  $\beta$ -Гал:  $>15$ ,  $>30$  і  $>60$  ОД. В кінцевому варіанті дослідження

в якості найбільш актуальних характеристик досліджуваних тестів визнано ВП+.

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** Активність НАГ сечі у обстежених хворих з ГН, НС, становила 79.3/27.6;207.8 ОД (від 1.3 до 1494.3 ОД), що значно перевищувало показники, отримані в контрольній групі (10.2/8.8;13.3 ОД,  $p < 0.001$ ). Найвищих значень показник сягав в активній стадії захворювання до початку терапії (152.6/79.5;236.5 ОД). Протягом спостереження під впливом запровадженого лікування документовано реверсію активності ферменту (8-10 тиждень: 62.4/26.2;266.3 ОД; 6-9 місяців: 36.5/23.2;101.3 ОД), без відновлення до значень контролю в катамнезі (21.2/12.5;37.2 ОД).

Зростання активності  $\beta$ -Гал сечі у обстежених хворих, на відміну від НАГ, було менш вагомим з медіаною показника 31.4/13.4;72.2 ОД (від 0.9 до 468.8 ОД). Активність  $\beta$ -Гал в контрольній групі (умовно здорових) виявилася вірогідно нижче (10.4/5.9;13.2 ОД,  $p < 0.001$ ). На етапах спостереження визначено поступове

зменшення підвищених значень  $\beta$ -Гал з більш повним відновленням показника на етапі кінцевого аналізу (до лікування: 64.9/24.4;106.4 ОД; 8-10-й тиждень: 31.1/12.8;75.3 ОД; 6-9-й місяці: 28.4/12.8;60.8 ОД; катамнез: 19.5/9.8;33.6 ОД).

Встановлені зміни активності реноспецифічних ензимів свідчить про стан тубулярного апарату нирок в момент обстеження, тобто визначені показники є біомаркерами стану. Розрахунок операційних характеристик для застосованих діагностичних тестів з визначенням ВП+ та урахуванням інтервалів значень показників, етапу спостереження перевів застосовані тести в іншу площину, обґрунтовуючи їх використання в якості прогностичних біомаркерів.

При аналізі операційних характеристик тестів на етапі розгорнутих клінічних проявів до початку терапії жодного вагального для прогнозу коефіцієнта ВП+ встановлено не було, що свідчило про відсутність прогностичного значення гіперензимурії як маркера прогресування ГН на цьому етапі (табл. 2 і 3).

Таблиця 2

**Визначення можливості прогресування ГН з НС у дітей при зростанні активності НАГ сечі на етапах обстеження**

Показник	Активність НАГ сечі		
	>17 ОД	>50 ОД	>100 ОД
до лікування			
ВП+	1.03 (0.93-1.15)	1.30 (1.10-1.55)	1.44 (1.09-1.91)
8-10 тижнів			
ВП+	1.18 (1.04-1.34)	2.43 (1.75-3.36)	2.94 (1.87-4.60)
6-9 місяців			
ВП+	1.18 (1.02-1.37)	1.93 (1.17-3.20)	3.52 (1.85-6.67)
катамнез			
ВП+	1.79 (1.32-2.41)	7.44 (3.36-16.49)	22.31 (5.59-89.00)

**Примітки:** дані представлено як ризик (95% довірчий інтервал); сірим кольором позначено зони високого ризику прогресування захворювання; ГН гломерулонефрит; НС нефротичний синдром; НАГ N-ацетил- $\beta$ -Д-глюкозамінідаза; ОД одиниць (мкмоль/год/ммоль креатиніну); ВП+ відношення правдоподібності позитивного результату.

Таблиця 3

**Визначення можливості прогресування ГН з НС у дітей при зростанні активності  $\beta$ -Гал сечі на етапах обстеження**

Показник	Активність $\beta$ -Гал сечі		
	>15 ОД	>30 ОД	>60 ОД
до лікування			
ВП+	1.10 (0.93-1.29)	1.29 (1.00-1.67)	<b>1.40 (0.96-2.03)</b>
8-10 тижнів			
ВП+	1.39 (1.07-1.79)	2.29 (1.59-3.29)	<b>3.53 (1.90-6.57)</b>
6-9 місяців			
ВП+	1.43 (1.13-1.79)	1.49 (0.94-2.35)	<b>2.81 (1.38-5.73)</b>
катамнез			
ВП+	<b>1.72 (1.18-2.50)</b>	<b>3.48 (1.80-6.72)</b>	<b>6.38 (1.55-26.27)</b>

**Примітки:** дані представлено як ризик (95% довірчий інтервал); сірим кольором позначено зони високого ризику прогресування захворювання; ГН гломерулонефрит; НС нефротичний синдром;  $\beta$ -Гал  $\beta$ -галактозидаза; ОД одиниць (мкмоль/год/ммоль креатиніну); ВП+ відношення правдоподібності позитивного результату.

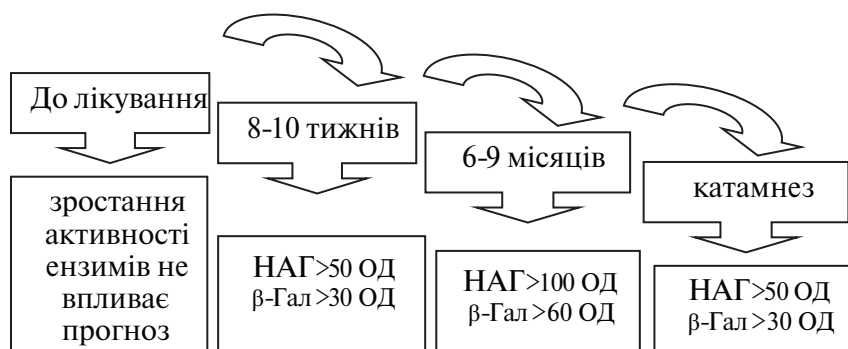
Ризик несприятливого перебігу захворювання на 8-10 тижні терапії зростає вдвічі при активності НАГ >50 ОД і β-Гал >30 ОД (ВП+ 2.43 та 2.29, відповідно). Досягнення більш високих значень НАГ (>100 ОД) прогноз суттєво не змінювали (ВП+ 2.94), але виявлення надвисоких величин β-Гал (>60 ОД) супроводжувалися зростанням вірогідності прогресування (ВП+ 3.53).

На підтримуючій терапії (6-9 місяць) ризик прогресування зафіксовано при підвищенні межі показників та зменшенні інтервалів активності ферментів (НАГ >100 ОД, β-Гал >60 ОД, ВП+ 3.52 та 2.81, відповідно). Рівень ензимурії нижче зазначених меж, хоча і міг перевищувати втричі норму (показники контрольної групи), не був

свідчення подальшого несприятливого перебігу захворювання, залишаючи хворим шанс на відновлення каналцевого апарату.

В катамнезі прогресування ГН з НС можна було прогнозувати вже при незначному підвищенні НАГ >17 ОД (ВП+ 1.79), при рівні показника >50 ОД вірогідність зростала в 7 і більше разів (ВП+ 7.44), а >100 ОД – в 22 рази (ВП+ 22.31). Високі значення ВП+ були характерні і при дослідженні β-Гал сечі: в інтервалі >15 ОД (ВП+ 1.72), значно зростаючи при звуженні діапазону (>30 ОД: ВП+ 3.48; >60 ОД: ВП+ 6.38).

Отримані результати дозволили створити ензимуричний фрагмент, який доповнив розроблену нами раніше систему мультимаркерного каскадного прогнозування (рис. 1) [4-6].



**Примітки:** НАГ N-ацетил-β-D-глюкозамінідаза; β-Гал β-галактозидаза; ГН гломерулонефрит; НС нефротичний синдром; ОД одиниць (мкмоль/год/ммоль креатиніну).

Рис. 1 Внесок ензимуричних маркерів сечі НАГ і β-Гал в систему каскадного паралельного мультимаркерного прогнозування несприятливого перебігу ГН з НС у дітей на різних етапах спостереження.

В основу системи закладено новий методологічний підхід до опрацювання традиційних діагностичних методик, який відповідає принципам доказової медицини - визначення межових значення показників та розрахунок операційних характеристик для кожного інтервалу (діапазону) значень. Це дає змогу виділити оптимальні строки проведення досліджень, за яких отримані межові значення набувають прогностичної цінності щодо прогресуючого перебігу ГН. В цьому випадку інтервальні значення результатів тесту набувають ваги сурогатних або третинних кінцевих точок наслідку (біомаркерів), співвіднесених з прогресуванням - наслідком захворювання у вигляді несурогатної вторинної кінцевої точки. Формування прогностичної системи з такого комплексу кінцевих точок (сурогатних та несурогатних) наближає результати дослідження до цілісної та якісної оцінки ефективності терапевтичного втручання. Зазначена система передбачає проведення паралельних досліджень з визначенням декількох показників (від найбільш чутливих до найбільш специфічних), що підвищує їх прогностичну цінність без зниження точності чи зростання вартості. Мультимаркерність системи дає змогу вибрати доступний

для клініки тест, у випадку необхідності – відмовитися від серійних (повторних) досліджень у конкретного хворого. Використання при створенні такої системи принципу каскаду (принципу доцільності проведення тесту на конкретному етапі спостереження послідовно від початку терапії до катамнезу) полегшує її застосування в клінічній нефрології. Актуальним є відкритість системи для поповнення іншими тестами, не використаними в даному дослідженні, як загально відомими, так і новітніми, значимість яких для прогнозу перебігу опрацьовано з залученням актуальних і простих операційних характеристик (ВП+, ВП-).

**ЗАКЛЮЧЕННЯ.** Для виваженої оцінки терапевтичного втручання доцільно формувати систему несурогатних і сурогатних наслідків захворювання, які визначають якісне виживання пацієнта на індивідуальному рівні. Дослідження активності ферментів сечі з лізосомною локалізацією та найбільш органоспецифічними властивостями щодо нирок показано використовувати в якості маркерів прогресування ГН з НС у дітей, враховуючи оптимальні терміни проведення тестів та межові інтервали показників, узагальнених в запропонованій системі прогно-

зування. Визначення цих маркерів при застосуванні сучасних методів аналізу даних збільшує цінність обсерваційних досліджень і в змозі дати відповіді на питання, які не можна вирішити через клінічні випробування або експеримент.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Багдасарова И. В. Иммуносупрессивная терапия нефротического синдрома у детей / И. В. Багдасарова, С. П. Фомина // Український журнал нефрології та діалізу. – 2007. – № 4. – С. 31-36.
2. Березин А. Е. Клиническое и прогностическое значение биологических маркеров в стратификации пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (обзор литературы) / А. Е. Березин // Укр. мед. часопис. – 2010. – № 6 (80). С. 79–85.
3. Лісозомна ензимурія як критерій дисфункції проксимальних канальців нирок у дітей при прогресуванні гломерулонефриту / Л. Я. Мигаль, І. В. Багдасарова, І. Є. Сербіна, Т. В. Кіндій // Перинатологія та педіатрія. – 2003. – № 3. – С. 39-41.
4. Фомина С. П. Імунотропна терапія дітей, хворих на гломерулонефрит з нефротичним синдромом: автор. ... доктора мед. наук : 14.01.37 / С. П. Фомина. – К., 2013. – 36 с.
5. Фомина С. П. Маркери прогресування нефротичного синдрому у дітей / С. П. Фомина // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2012. – № 6. – С. 22-25.
6. Фомина С. П. Радионуклідные маркеры прогрессирования гломерулонефрита с нефротическим синдромом у детей / С. П. Фомина // Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии. – 2012. – № 3. – С. 12-16.
7. Bazzi C. Urinary N-acetyl-b-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis / C. Bazzi, C. Petrini, V. Rizza, [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2002. – Vol. 17. – P. 1890–1896.
8. Beta-2-microglobulin is superior to N-acetyl-beta-glucosaminidase in predicting prognosis in idiopathic membranous nephropathy / Hofstra J. M., Deegens J. K. J., Willems H. L., Wetzels J. F. M. // Nephrol. Dial. Transplant. – 2008. – Vol. 23. – P. 2546–2551.
9. Biomarkers definitions working group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework // Clin. Pharmacol. Ther. – 2001. – Vol. 69 (3). – P. 89–95.
10. KT Clearinghouse [Електронний ресурс] / Canadian institute of health research, Centre for evidence-based medicine. Toronto, 2000-2011. – Режим доступу : <http://ktclearinghouse.ca/cebmlpractise/ca/>
11. Lemley K. V. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease / K. V. Lemley // Pediatr. Nephrol. – 2007. – Vol. 22. – P. 1849–1859.
12. Tesch G. H. Review: serum and urine biomarkers of kidney disease: a pathophysiological perspective / G. H. Tesch // Nephrology. – 2010. – Vol. 15. – P. 609–616.

Надійшла до редакції 29.07.2013

Прийнята до друку 07.08.2013