

На правах рукописи

ПТИЦЫНА
Анна Игоревна

**МАРКЕРЫ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПОСЛЕ
КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук профессор

Козлов Антон Владимирович

Научный консультант:

доктор медицинских наук профессор

Курапеев Илья Семенович

Официальные оппоненты:

Гильманов Александр Жанович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, институт дополнительного профессионального образования, кафедра лабораторной диагностики, заведующий.

Годков Михаил Андреевич – доктор медицинских наук, ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», научный отдел лабораторной диагностики, заведующий.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «30» июня 2020 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://nrserm.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Актуальным вопросом клинической лабораторной диагностики остается поиск ранних лабораторных маркеров острого повреждения почек (ОПП) после кардиохирургических вмешательств. Совершенствование методов выявления острого повреждения почек с использованием лабораторных маркеров обеспечит выявление ОПП на ранних стадиях, что приведет к своевременному лечению и снижению возникновения осложнений [Kashani K., 2020].

Острое повреждение почек является тяжелым и часто фатальным осложнением, развивающимся после кардиохирургических вмешательств [Case J., 2013; Meersch M., 2014; Pannu N., 2016; Рыбка М.М., 2016; Шарипова В.Х., 2018]. Частота его развития после операций на сердце может колебаться от 5% до 42% [Brown J.R., 2010; Искендеров Б.Г., 2013; Wang Y., 2017]. ОПП после операции на сердце является второй по распространенности, после сепсиса, причиной нахождения пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), удлинняя их пребывание в ОРИТ, в ряде случаев требуя проведения диализа [Case J., 2013; McIlroy D.R., 2014; Uchino S., 2005; Wang Y., 2017]. Риск смертельного исхода, связанный с развитием ОПП, сохраняется высоким в течение 10 лет после кардиохирургических вмешательств даже у пациентов с восстановившейся функцией почек [Мензоров М.В. 2013; McIlroy D.R., 2014].

В настоящее время выявление ОПП базируется на клинических рекомендациях, разработанных в 2012 г группой экспертов KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes), в которых основное внимание уделяется учету динамики креатининемии [Khwaja A., 2012]. В связи с тем, что концентрация креатинина в крови зависит от многих факторов, его использование как маркера ОПП признают недостаточно информативным, особенно в первые часы развития ОПП [Смирнов А.В., 2015; Elmedany S., 2017]. Это является стимулом для поиска маркеров ОПП с более высокой диагностической информативностью в первые часы развития ОПП [Duan S.B., 2013; Meersch M., 2014].

Микроскопия осадка мочи с полуколичественным (в поле зрения - п/зр) подсчетом элементов в осадке и расчетом индексов UMS (urine microscopy score) и CSI (cast scoring index) не получила распространения в связи недостаточной чувствительностью для раннего выявления ОПП [Chawla L.S., 2008; Perazella M., 2010].

Последние годы интерес исследователей привлекла группа «биохимических» маркеров ОПП, из которых липокалину-2 отводили роль «ренального тропонина» [Haase M., 2010; Вельков В.В., 2011]. Несмотря на то, что представление об исключительной диагностической

значимости липокалина-2 на ранних стадиях ОПП стало подвергаться сомнению, его продолжают использовать в качестве маркера ОПП у детей в кардиохирургической практике [McIlroy D.R., 2010, Zhou F., 2016].

Информативность таких маркеров ОПП, как молекула повреждения почек-1 (КИМ-1), интерлейкин-18 (ИЛ-18), тканевой ингибитор металлопротеиназы-2 (ТИМР-2), белок 7, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-7) для предсказания ОПП может существенно различаться, что тормозит их использование в практической работе [Zhou F., 2016]. Неоправданное назначение биомаркеров ОПП без учета аналитических параметров метода может вводить в заблуждение лечащих врачей, в ряде случаев не влияя на результаты лечения и повышая стоимость диагностического и лечебного процесса [Perazella M., 2015]. Вследствие этого, стали появляться публикации, в которых под сомнение ставилась не только целесообразность, но и сама принципиальная возможность выявления ОПП с использованием биомаркеров [McIlroy D.R., 2010, Zhou F., 2016].

Все перечисленное подтверждает актуальность поиска ранних лабораторных маркеров ОПП после кардиохирургических вмешательств для своевременного начала терапии и снижения частоты возникновения осложнений.

Степень разработанности темы исследования

Анализ литературных данных указывает на то, что многие проблемы широкого использования биомаркеров ОПП в кардиохирургической практике требуют дополнительного изучения.

Среди них проблема выявления и уточнения в контролируемых сравнительных испытаниях в когортных группах пациентов маркера или группы маркеров ОПП с высокой чувствительностью и специфичностью, особенно у пациентов с сопутствующими заболеваниями - сахарным диабетом (СД), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), хронической болезнью почек (ХБП), заслуживает внимания [Минеев В.Н., 2015; Zhou F., 2016; McCaffrey J., 2017; McIlroy D.R., 2010; Schiffl H., 2017]. Сочетание ХБП и ИБС представляет особый интерес, поскольку в ходе кардиохирургического вмешательства выведение с мочой почечных белков-маркеров может меняться в зависимости от стадии хронической болезни почек и сказываться на чувствительности и специфичности теста. Другая – аналитическая проблема, заключается в том, что определение большинства известных маркеров ОПП не может быть проведено в режиме point-of-care, из-за чего ценность результатов снижается вследствие временной задержки их получения клиницистами.

Одним из подходов к решению данных проблем является поиск доказательств принципиальной возможности использования количественного метода оценки отдельных компонентов осадка мочи в качестве «микроскопических маркеров» ОПП. Сравнение

аналитических характеристик микроскопических и биохимических маркеров ОПП после кардиохирургических вмешательств, проведенное одновременно в двух группах пациентов с различным исходным состоянием почек позволит приблизиться к решению указанных выше задач.

Цель исследования: оценить диагностическую информативность микроскопических и биохимических маркеров острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических вмешательств в зависимости от исходного состояния функции почек.

Задачи исследования

1. Предложить количественный метод обнаружения в осадке мочи гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия и оценить возможность их использования в качестве маркеров острого повреждения почек у пациентов кардиохирургического профиля.

2. Сравнить особенности выведения с мочой гиалиновых цилиндров, клеток почечного эпителия, липокалина-2 и интерлейкина-18 у пациентов с различной исходной функцией почек после кардиохирургических вмешательств.

3. Оценить диагностическую информативность использования биохимических и микроскопических маркеров для выявления острого повреждения почек на ранних стадиях после кардиохирургических вмешательств.

4. Определить значимость скорости клубочковой фильтрации до операции на информативность микроскопических и биохимических маркеров для раннего выявления острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических вмешательств.

Научная новизна

Впервые установлена принципиальная возможность использования в качестве маркеров острого повреждения почек гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия для выявления ОПП в режиме реального времени. Показано, что стандартизация метода получения осадка мочи, количественный подсчет элементов мочи в счетной камере в режиме фазового контраста делает метод высокоспецифичным для выявления ОПП, поскольку эти маркеры являются высокоспецифичными для повреждения почечных канальцев. Доказано, что высокой диагностической информативностью обладают гиалиновые цилиндры, клетки почечного эпителия, интерлейкин-18 и липокалин-2 в качестве ранних маркеров острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических операций при достижении максимальной концентрации в моче.

Выявлены временные различия появления в моче у пациентов с острым повреждением почек после кардиохирургических вмешательств маркеров ОПП. Это указывает на различные патохимические механизмы их выведения. Первыми максимальных значений в моче достигают биохимические маркеры ОПП: интерлейкин-18 и липокалин-2, пиковые значения приходятся на

2 часа после операции, после чего их концентрация снижается. Микроскопические маркеры острого повреждения почек достигают максимума позднее: гиалиновые цилиндры – через 4 часа, клетки почечного эпителия – через 24 после оперативного вмешательства. Установлено, что по своим аналитическим характеристикам в период пиковых значений показатели площади под кривой (AUC) у всех маркеров ОПП сравнимы. Доказано, что все изученные маркеры обладают высокой диагностической информативностью для выявления острого повреждения почек после кардиохирургических вмешательств только у пациентов со скоростью клубочковой фильтрации выше $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$. Охарактеризован интервал значений скорости клубочковой фильтрации от 50 до $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$, в котором все указанные биомаркеры не обладают требуемыми аналитическими характеристиками для диагностики ОПП. Последнее указывает на то, что следует продолжать поиск маркеров, способных предсказывать ОПП у данной категории кардиохирургических пациентов.

Теоретическая и значимость работы

Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в том, что полученные результаты изменяют сложившиеся представления о диагностической информативности различных биомаркеров (микроскопических и биохимических) у пациентов с острым повреждением почек после кардиохирургических вмешательств. Показано, что скорость выделения с мочой различных биомаркеров обусловлена участием различных патохимических механизмов на протяжении первых суток развития ОПП. Раннее появление маркеров в моче укладывается в классические представления о динамике выведения низкомолекулярных внутриклеточных белков (интерлейкин-18 и липокалин-2) во внеклеточную жидкость в результате ишемического повреждения мембран эпителия почечных канальцев. В то же время обнаружение клеток почечных канальцев в моче обусловлено запуском процессов апоптоза и «соскальзыванием» клеток в просвет канальца.

Практическая значимость работы

Для выявления острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических вмешательств следует выполнять определение в моче концентрации биохимических маркеров интерлейкина-18, липокалина-2 на фоне пиковых значений через 2 часа после операции.

Получение осадка мочи для определения концентрации элементов следует проводить стандартизированным методом. Определение микроскопических маркеров (гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия) следует проводить количественным методом счета в камере с использованием микроскопии в режиме фазового контраста.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в дизайне открытого рандомизированного контролируемого проспективного исследования в параллельных группах. Для реализации цели и задач

исследования и обоснования положений были использованы анализ литературы, биохимические, общеклинические методы, статистическая обработка данных и обобщение результатов. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова (протокол заседания № 12 от 23 октября 2015 года).

Соответствие паспорту специальности

Тема работы, использованные методы и материалы, полученные результаты и их обсуждение, выводы и практические рекомендации соответствуют паспорту специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика (пункты 2, 7, 8).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Гиалиновые цилиндры и клетки почечного эпителия при определении в осадке мочи, полученном в стандартных условиях центрифугирования, количественном подсчете в счетной камере, микроскопии в режиме фазового контраста могут использоваться в качестве маркеров острого повреждения почек.

2. Диагностическая значимость оценки биохимических и микроскопических маркеров возрастает при адекватном выборе времени определения аналитов.

3. Исходное состояние почек определяет выбор маркеров острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических вмешательств.

Степень достоверности

Достоверность и обоснованность полученных результатов научной работы обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, достаточным количеством проведенных исследований и адекватным статистическим анализом полученных данных. Сформированные и обследованные группы больных сопоставимы по возрасту, репрезентативны по количеству и могли использоваться для решения поставленных задач.

Личное участие автора в получении результатов

Диссертант лично участвовал в планировании и организации научной работы. Автор самостоятельно выполнил исследование микроскопии осадка мочи, определение концентрации интерлейкина-18, липокалина-2. Все материалы, представленные в диссертационном исследовании, получены, обобщены, статистически обработаны и проанализированы автором лично.

Апробация и внедрение результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Основные положения диссертации представлены и доложены на:

– Юбилейной конференции, посвященной 90-летию кафедры клинической лабораторной диагностики: «Лаборатория вчера, сегодня, завтра» (Санкт-Петербург, 2016);

- III Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2017);
- Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Профилактическая медицина-2017» (Санкт-Петербург, 2017);
- IV Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2018);
- XI Съезде Российского профсоюза медицинских работников экстракорпоральных технологий (Калининград, 2018).

Результаты исследования используются в учебном процессе на цикле «Клиническая лабораторная диагностика» на кафедре клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (Санкт-Петербург) и на цикле «Анестезиология и реаниматология (с углубленным изучением анестезии и периоперационной интенсивной терапии у пациентов высокого риска)» на кафедре анестезиологии и реаниматологии им. проф. В.Л. Ваневского ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (Санкт-Петербург).

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебно-диагностический процесс отдела экстренных исследований клинико-диагностической лаборатории СПб ГБУЗ «Городской многопрофильной больницы № 2».

Результаты настоящего исследования использованы при написании 6 и 7 глав руководства для врачей – Анализ мочи: руководство для врачей / А.В. Козлов. – Москва: СИМК, 2019. – 256 с.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 103 страницах, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиографический указатель включает 148 работ, в том числе 35 отечественных и 113 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 9 таблицами и 17 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика пациентов

Исследование выполнено в соответствии с принципами «Надлежащей клинической практики» (ГОСТ Р 52379-2005). Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова (протокол заседания № 12 от 23.10.2015 года). В период с мая 2016 года по декабрь 2017 года было прооперировано 111 пациентов обоего пола, которым в плановом порядке было выполнено коронарное шунтирование (КШ) изолировано или в сочетании с коррекцией клапанной патологии сердца.

Клинической базой для исследования явилась кафедра клинической лабораторной диагностики (заведующий кафедрой д.м.н., профессор А.В. Козлов), кафедра анестезиологии и реаниматологии им. В.Л. Ваневского (заведующий кафедрой д.м.н., профессор К.М.

Лебединский), отделение клинической лабораторной диагностики (заведующая отделением к.м.н. В.В. Слепышева) и отделение анестезиологии и реанимации (заведующий отделением к.м.н. А.Н. Ванюшкин) клиники им. Э.Э. Эйхвальда ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Работа выполнена в дизайне открытого рандомизированного контролируемого проспективного исследования в параллельных группах в соответствии с принципами и правилами доказательной медицины.

Критериями включения в исследование явилось:

- наличие показаний для проведения планового КШ изолировано или в сочетании с коррекцией клапанной патологии сердца у пациентов в возрасте старше 18 лет.

Критериями исключения были:

- операции на корне аорты;
- экстренные и неотложные оперативные вмешательства;
- повторное кардиохирургическое вмешательство;
- наличие цереброваскулярной болезни мозга в соответствии с классами 100-199 по МКБ-10;
- наличие инфекционного эндокардита в соответствии с классом 133 по МКБ-10;
- ятрогении в соответствии с классами T80-T88 по МКБ-10;
- необходимость диализа до операции;
- скорость клубочковой фильтрации до операции менее $50 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$.

В ходе работы было сформировано 2 группы пациентов в зависимости от величины скорости клубочковой фильтрации (СКФ) до операции. Градация СКФ для включения в группу использовалась в соответствии со шкалой прогнозируемой летальности EuroSCORE II, представлена в таблице 2.1 [Howell N., 2013].

В первую группу (1-я группа) были включены 25 пациентов, у которых величина СКФ превышала $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ (20 мужчин и 5 женщин, возраст – от 30 до 81 лет ($60,1 \pm 12,8$)). Вторую группу (2-я группа) составили 86 пациентов, у которых величина СКФ была от 50 до $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ (54 мужчины и 32 женщины, возраст – от 38 до 82 лет ($63,4 \pm 9,5$)). Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Клиническая характеристика пациентов по группам (n = 111)

Признаки	1-я группа СКФ >85	2-я группа СКФ 50-85	p
Средняя сумма баллов EuroSCORE-I, M±SD	2,9±1,9	3,4±2,3	p=0,34
Прогнозируемая летальность EuroSCORE-II, %, M±SD	1,1±0,8	1,6±1,0	p>0,05
Женщин, n (%)	5 (20,0%)	32 (38,4%)	p<0,05
Возраст, лет M±SD [min; max]	60,1±12,8 [30; 81]	63,4±9,5 [38; 82]	p=0,09
Возраст ≥ 60 лет, n (%)	15 (60,0%)	55 (64,0%)	p>0,05
Индекс массы тела, кг/м ² M±SD	26,3±3,7	28,4±4,3	p=0,07
Концентрация креатинина, мкмоль/л, M±SD [min; max]	91,0±10,2 [71; 114]	96,0±21,4 [64; 186]	p=0,47
Класс сердечной недостаточности по NYHA, M±SD	2,3±0,5	2,4±0,6	p=0,62
Всего больных, n (%)	25 (22,5%)	86 (77,5%)	

Примечание: СКФ (мл×мин⁻¹) – скорость клубочковой фильтрации, NYHA – класс сердечной недостаточности по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца.

Объем выполненных операций в группах пациентов значительно не отличался, данные распределения по виду оперативного вмешательства представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Распределение больных по видам оперативных вмешательств (n = 111, p >0,05)

Группы больных	Всего операций	КШ	КШ+ПКС
1-я группа СКФ >85	25	15	10
2-я группа СКФ 50-85	86	51	35

Примечание: КШ – коронарное шунтирование; ПКС – патология клапанов сердца.

По окончании операции все пациенты были переведены в отделение реанимации и интенсивной терапии.

Лабораторные методы исследования

Были проведены следующие виды лабораторных исследований:

1. определение концентрации креатинина в сыворотке крови;
2. общий анализ мочи с количественным подсчетом элементов осадка мочи: эритроцитов; лейкоцитов; гиалиновых, зернистых цилиндров; клеток почечного эпителия с использованием световой и фазово-контрастной микроскопии;
3. определение в моче концентрации интерлейкина-18 моче;
4. определение в моче концентрации липокалина-2 в моче.

Определение концентрации креатинина в сыворотке крови

Концентрацию креатинина в сыворотке крови определяли до операции, на 1, 2 и 3 сутки после. Для получения сыворотки венозную кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1500 g (центрифуга «СМ-6 МТ» фирмы «ELMI», Латвия).

Концентрацию креатинина в крови определяли пикратным методом, адаптированным производителем «Beckman Coulter» (США) к анализатору «Olympus AU480 Chemistry Analyzer».

Референтные значения для данного метода по данным компании производителя составляют: мужчины 80–115 мкмоль/л, для женщин 53–97 мкмоль/л.

Для определения СКФ использовали расчетную формулу Кокрофта-Голта с поправкой на поверхность тела пациента:

Для мужчин (норма 90-150 мл×мин⁻¹)

Для женщин (норма 90-130 мл×мин⁻¹)

Общий анализ мочи с количественным подсчетом форменных элементов осадка мочи

Всем пациентам до операции, через 2, 4 и 24 часа от момента поступления в ОРИТ проводили исследование химического состава мочи тест-полосками Uriscan (YD Diagnostics, Корея), анализатор URISCAN optima/Pro (YD Diagnostics, Корея) и количественного подсчета форменных элементов осадка мочи

Материалом для исследования служили образцы мочи, полученные до операции, через 2, 4 и 24 часа от момента поступления пациента в ОРИТ. Анализ мочи выполняли не позднее 30 минут после забора материала. Образцы мочи во время нахождения в ОРИТ собирали с помощью катетера.

Осадок получали центрифугированием 10 мл мочи при 400g 5 мин (центрифуга СМ-6 МТ ELMI), надосадочную жидкость (9 мл) аликвотировали, замораживали и хранили при -60 °С до использования для определения концентрации ИЛ-18 и липокалина-2. Осадок тщательно перемешивали в оставшемся 1 мл мочи, заполняли камеру Фукс-Розенталя. Эритроциты, лейкоциты, различные типы цилиндров, клетки почечного эпителия и другие элементы организованного состава мочи подсчитывали в камере Фукс-Розенталя, микроскоп («Leica DM 4000 В» фирмы «Leica Microsystems GmbH», Германия, объектив 10× (40×), окуляр 10×, используя метод фазово-контрастной микроскопии).

Элементы осадка подсчитывали во всей камере, приводя количество элементов к 1 мкл мочи по формуле $x = (a \times 1000) / (3,2 \times V)$, где

x – количество элементов в 1 мкл мочи;

a – общее количество элементов в камере;

V – объем мочи, взятый для центрифугирования (мкл);

1000 – объем мочи, оставленный для ресуспендирования (мкл);

3,2 – объем камеры Фукс-Розенталя.

Концентрацию элементов выражали в 1 мкл (количество/мкл).

Определение концентрации интерлейкина-18 в моче

Концентрацию интерлейкина-18 (ИЛ-18) в моче определяли методом иммуноферментного анализа (тест-система ИНТЕРЛЕЙКИН-18 – ИФА – БЕСТ) «Вектор-БЕСТ», Россия), с использованием анализатора «MR-96A» («Mindray», Китай). Набор предназначен для определения концентрации человеческого ИЛ-18 в биологических жидкостях человека и культуральных средах.

Метод основан на «сэндвич» – варианте твердофазного (ТИФА) иммуноферментного анализа с использованием двух типов моноклональных антител (МАТ), специфичных к двум разным эпитомам интерлейкина-18.

Определение концентрации липокалина-2

Концентрацию липокалина-2 в моче определяли методом ИФА тест-системами компании «Nucult® Biotech» (США), используя анализатор «MR-96A» («Mindray», Китай). Набор предназначен для определения концентрации липокалина-2 в плазме, моче и культуральных средах. С его помощью определяют мономерные и димерные молекулы липокалина-2, а также липокалина-2 в комплексе с матричной металлопротеиназой-9.

Методы сбора и анализа данных

Накопление, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов проводилась с использованием программы «Microsoft Excel-2010» фирмы «Microsoft Corporation» (США).

Для статистического анализа результатов исследования использовали пакет программы «STATISTICA for Windows» версия Russian Portable 10.0.1011.0, 2001 фирмы «StatSoft Inc», США с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Диагностическую ценность исследуемых маркеров определяли с помощью ROC-анализа. Рассчитывали отношение правдоподобий LR (LikelihoodRatio) – показатель, объединяющий информацию о чувствительности и специфичности, используемый для оценки вероятности заболевания на основании положительного [LR(+)] и отрицательного [LR(-)] результата тестов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение результатов подсчета гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия при световой и фазово-контрастной микроскопии

Подготовка образцов мочи, получение осадка для световой микроскопии, подсчет элементов являются в целом, рутинными процедурами для выявления изменений в моче при различных заболеваниях. Это, как правило, не является существенной проблемой в рутинной работе в клиничко-диагностических лабораториях. В ряде зарубежных монографий и публикаций авторы отдают предпочтение фазово-контрастной микроскопии при изучении осадка мочи нефрологических пациентов, указывая на ее более высокую чувствительность [Fogazzi G.B., 2010; Bagshaw S.M., 2012; Brunzel N.A., 2013]. В большинстве отечественных лабораторий сотрудники недостаточно знакомы с данным методом, в связи с чем он не получил широкого распространения, и остается практически невостребованным, несмотря на продолжающийся выпуск фазово-контрастного устройства ФАТЕК М6-7 (АО ЛОМО) для микроскопов МИКМЕД 6 вариант 7.

В связи с этим нами была проведена серия исследований, направленных на сравнение результатов подсчета организованных элементов осадка с применением световой микроскопии и фазово-контрастной микроскопии.

С этой целью подсчет элементов в камере Фукс-Розенталя проводили в режиме световой микроскопии, затем в тех же квадратах их подсчитывали с использованием фазово-контрастной микроскопии, путем смены объектива поворотом револьверного держателя. Концентрацию в препарате элементов осадка мочи выражали в количестве элементов в 1 мкл мочи.

Микроскопический анализ проводился одним оператором (Птицына А.И.) с использованием микроскопа «Leica DM 4000 B» («Leica Microsystems GmbH», Германия), объектив 10× (40×), окуляр 10×.

Гиалиновые цилиндры. По результатам подсчета гиалиновых цилиндров в моче при использовании световой и фазово-контрастной микроскопии было выявлено, что их концентрация была достоверно ниже при проведении метода с использованием световой микроскопии ($Me\ 0,3\ [0; 0,09]$), чем при фазово-контрастной ($Me\ 0,8\ [0,1; 0,22]$) ($p=0,003$). Результаты представлены на рисунке 1.

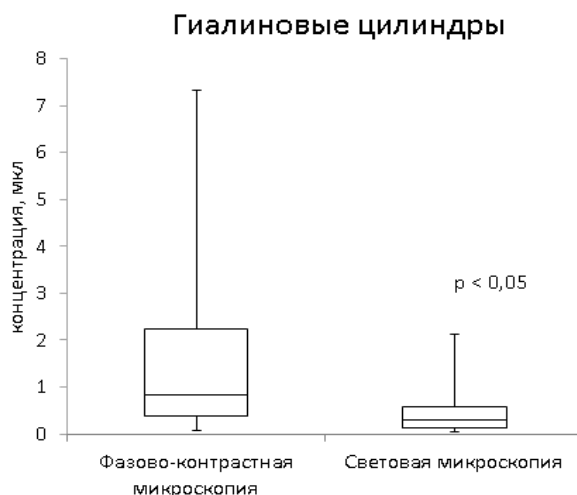


Рисунок 1 - Концентрация гиалиновых цилиндров в моче при использовании методов фазово-контрастной и световой микроскопии.

Клетки почечного эпителия. Ввиду того, что мелкие прозрачные включения клеток, невидимые в светлом поле, дают контрастную интерференцию с фоном и становятся видимыми (рис. 3.7, 3.8), облегчается процесс их идентификации было выявлено, что концентрация клеток почечного эпителия в моче была достоверно ниже при использовании световой микроскопии (Me 0,1 [0,03; 0,32]) по сравнению с фазово-контрастной (Me 0,2 [0,08; 0,47]) ($p=0,005$). Результаты представлены на рисунке 2.

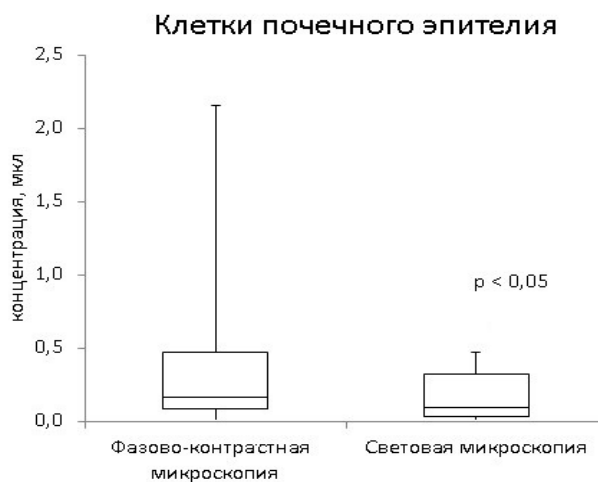


Рисунок 2 - Концентрация клеток почечного эпителия в моче при использовании методов фазово-контрастной и световой микроскопии.

Таким образом, в предварительной серии экспериментов нами было установлено:

1. использование фазово-контрастной микроскопии существенно облегчает визуализацию гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия, что улучшает их идентификацию;
2. подсчет гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия в камере Фукс-Розенталя дает возможность количественно оценить их наличие и провести в дальнейшем статистическую обработку.

Оценка динамики исследуемых параметров у пациентов до операции и после кардиохирургического вмешательства

Концентрация креатинина в сыворотке крови. Как следует из данных, представленных на рис. 3.9, динамика концентрации креатинина у пациентов в 1-й и 2-й группах существенно отличалась. О наступлении ОПП судили по нарастанию в крови концентрации креатинина на 26,5 мкмоль/л и более в течение 48 часов относительно исходного уровня. У пациентов 1-й группы без ОПП его концентрация в крови не менялась на протяжении 3 суток после операции, у пациентов с ОПП она достоверно повышалась на 1-е сутки по сравнению с исходным уровнем. На 2-е сутки после операции концентрация креатинина возвращалась к исходным значениям и оставалась на данном уровне на 3-и сутки после операции.

У пациентов 2-й группы без ОПП концентрация креатинина в крови достоверно не менялась на протяжении 3 суток после операции, у пациентов с ОПП она достоверно повышалась на 1-е сутки по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$), и сохранялась на данном уровне на 2-е и 3-и сутки после операции.

Из данных, представленных на рис. 3, следует, что у пациентов 1-й группы с ОПП максимум креатининемии наблюдался через 24 часа после операции, затем уровень снижался до исходного через 48 часов, и сохранялся до последнего измерения через 72 часа. Различия в концентрации креатинина в крови у пациентов с ОПП и без ОПП были достоверны через 24 часа после операции.

У пациентов 2-й группы с ОПП концентрация креатинина в крови достоверно ($p < 0,05$) повышалась через 24 часа после операции, достигала максимума через 48 часов, и снижалась практически до исходных значений через 72 часа. Концентрация креатинина в крови у пациентов с ОПП достоверно превышала его концентрацию у пациентов без ОПП через 24 и 48 часов после операции (рис. 3).

Частота развития ОПП в обеих группах статистически не отличалась ($p > 0,05$) и составила в 1-й группе – 20% ($n = 5$), во 2-й группе – 26% ($n = 22$).

Гиалиновые цилиндры. В 1-й группе концентрация гиалиновых цилиндров в моче пациентов с ОПП и без ОПП достоверно превысила исходные значения через 2 часа после операции ($p < 0,05$), данный уровень сохранялся через 4 и 24 часа (рис. 4). Концентрация гиалиновых цилиндров в моче у пациентов с ОПП была достоверно выше их концентрации у пациентов без ОПП через 2, 4 и 24 часа после операции.

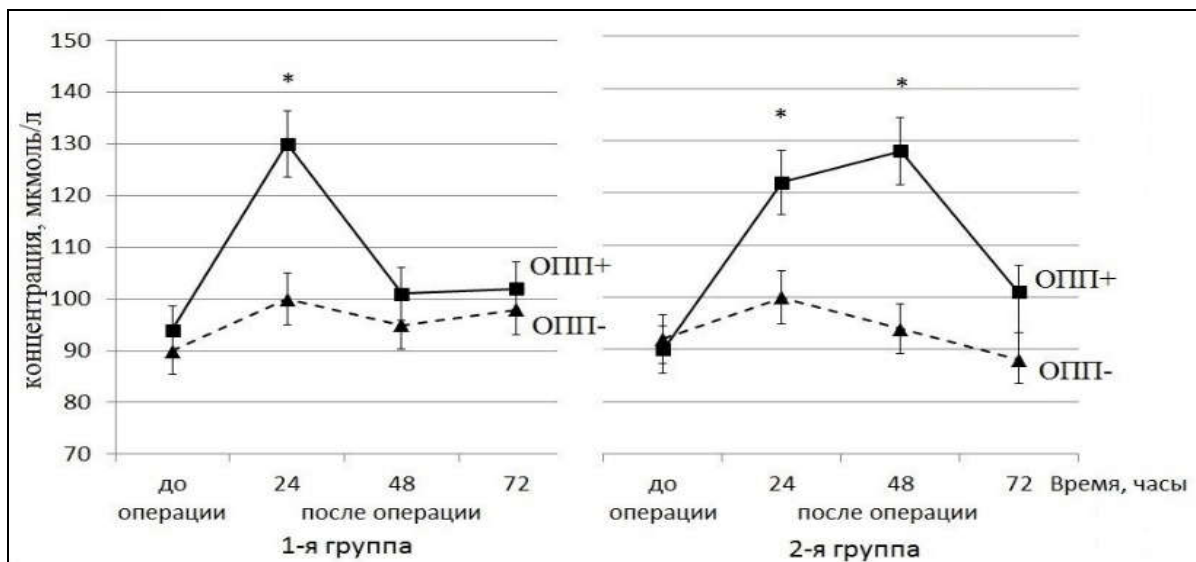


Рисунок 3 - Динамика изменения концентрации креатинина в сыворотке крови у пациентов в течение 72 часов после кардиохирургических вмешательств (*) достоверные различия между пациентами с ОПП (ОПП+) и без ОПП (ОПП-) в группе ($p < 0,05$)

Во 2-й группе динамика изменения концентрации гиалиновых цилиндров в моче была менее выраженной, чем в 1-й группе. Их концентрация в моче пациентов с ОПП и без ОПП достоверно превышала исходные значения через 2 часа после операции ($p < 0,05$) и сохранялась на данном уровне через 4 и 24 часа после операции. У пациентов 2-й группы с ОПП концентрация гиалиновых цилиндров в моче была достоверно выше их концентрации у пациентов без ОПП через 2 и 4 часа после операции (рис 4).

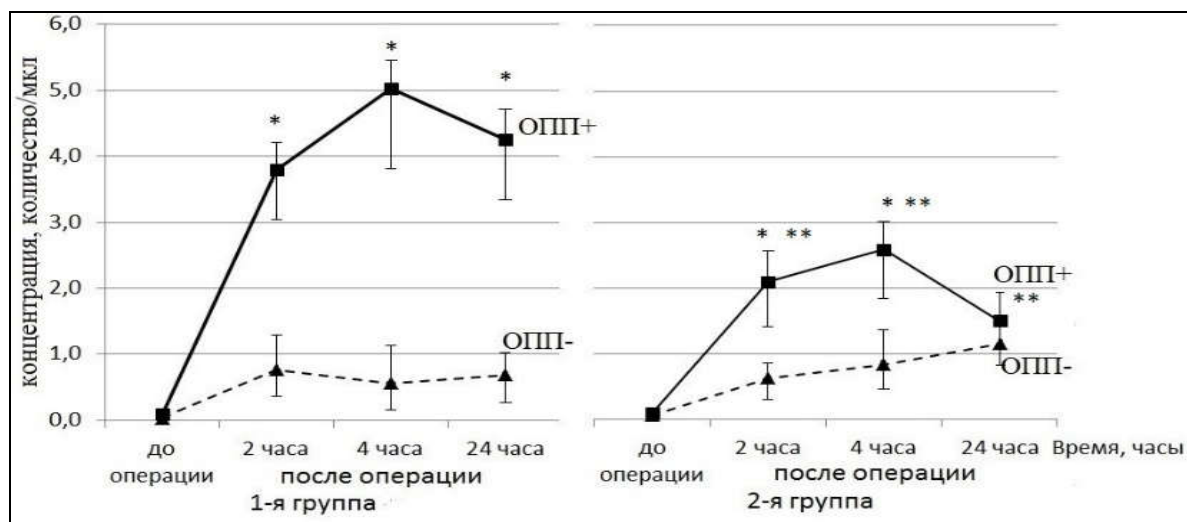


Рисунок 4 - Динамика изменения концентрации гиалиновых цилиндров в моче у пациентов в течение 24 часов после кардиохирургических вмешательств (*) достоверные различия между пациентами с ОПП (ОПП+) и без ОПП (ОПП-) в группе ($p < 0,05$); (**) достоверные различия между пациентами с ОПП в 1-й и 2-й группе ($p < 0,05$)

Клетки почечного эпителия. В 1-й группе у пациентов с ОПП через 2 часа после операции было обнаружено достоверное увеличение концентрации клеток почечного эпителия

в моче по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$), концентрация возрастала до максимальных значений через 24 часа после операции (рис. 5).

У пациентов 2-й группы с ОПП через 2 часа после операции концентрация клеток почечного эпителия в моче также достоверно превышала исходный уровень через 2 часа ($p < 0,05$), оставалась на этом уровне через 4 часа и достигала максимума через 24 часа после операции.

У пациентов обеих групп без ОПП концентрация клеток почечного эпителия практически не менялась, и была достоверно ниже ($p < 0,05$) значений у пациентов с ОПП через 2, 4 и 24 часа (рис. 5).

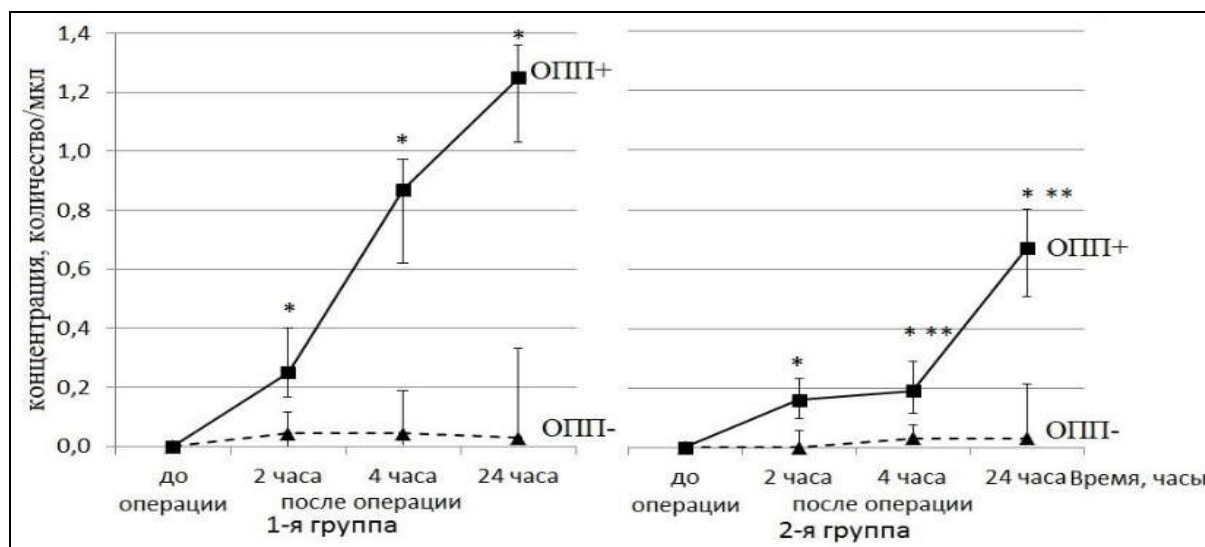


Рисунок 5 - Динамика изменения концентрации клеток почечного эпителия в моче у пациентов в течение 24 часов после кардиохирургических вмешательств.

*) достоверные различия между пациентами с ОПП (ОПП+) и без ОПП (ОПП-) в группе ($p < 0,05$)

**) достоверные различия между пациентами с ОПП в 1-й и 2-й группе ($p < 0,05$)

Интерлейкин-18 (ИЛ-18). В 1-й группе концентрация ИЛ-18 в моче у пациентов с ОПП достигала максимума через 2 часа после операции, через 4 часа снижалась, достоверно превышая исходные значения ($p < 0,05$), через 24 часа возвращалась к исходным значениям (рис. 6). У пациентов без ОПП изменений концентрации ИЛ-18 в моче выявлено не было. Достоверные различия в концентрации ИЛ-18 у пациентов с ОПП и без ОПП выявлены через 2 и 4 часа после операции.

Во 2-й группе достоверных различий в концентрации ИЛ-18 в моче у пациентов с ОПП и без ОПП выявлено не было (рис. 6).

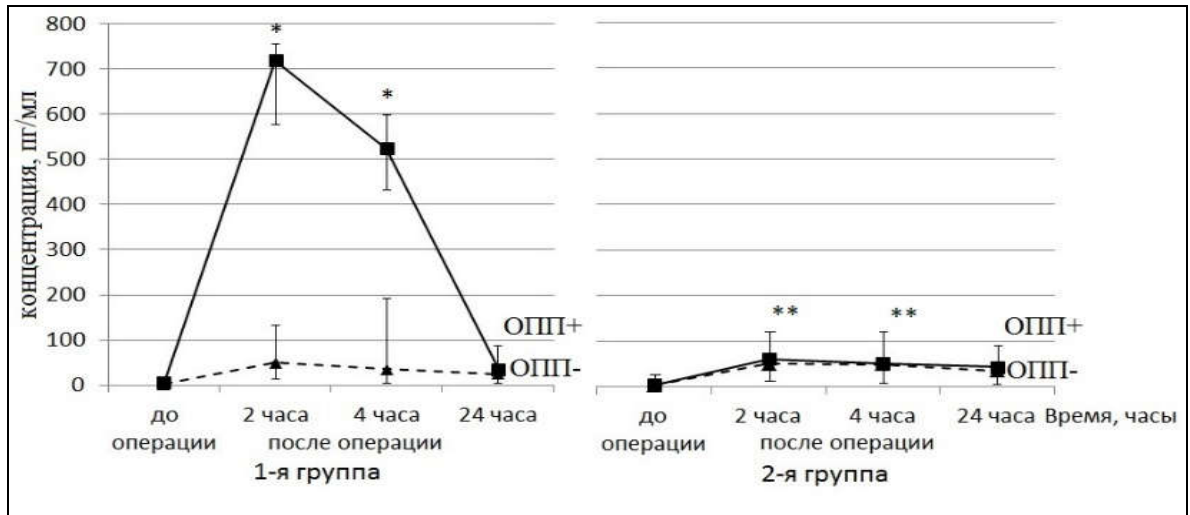


Рисунок 6 - Динамика изменения концентрации интерлейкина-18 в моче у пациентов в течение 24 часов после кардиохирургических вмешательств.

*) достоверные различия между пациентами с ОПП (ОПП+) и без ОПП (ОПП-) в группе ($p < 0,05$)

**) достоверные различия между пациентами с ОПП в 1-й и 2-й группе ($p < 0,05$)

Липокалин-2 (NGAL). Концентрация липокалина-2 в моче у пациентов 1-й группы с ОПП достигала максимума через 2 часа после операции, через 4 часа снижалась, достоверно превышая исходные значения ($p < 0,05$), через 24 часа возвращалась к исходным значениям (рис. 7). У пациентов без ОПП концентрации NGAL в моче достоверно повышалась через 2 часа, через 4 часа возвращалась к исходным значениям и оставалась на данном уровне через 24 часа после операции. Достоверные различия в концентрации NGAL у пациентов с ОПП и без ОПП выявлены через 2 и 4 часа после операции.

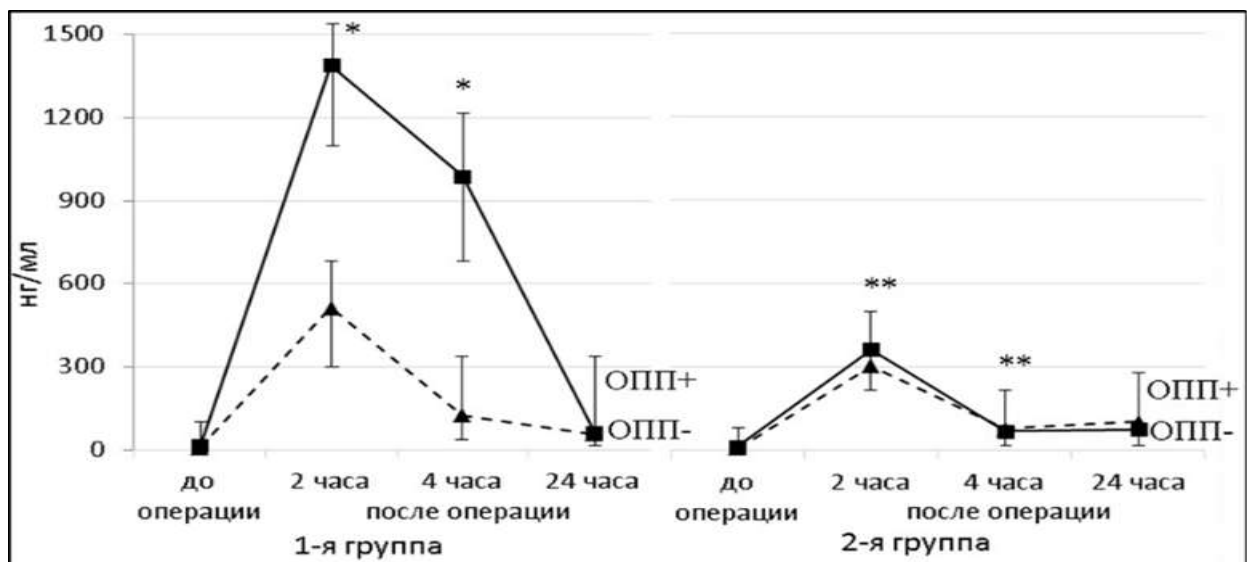


Рисунок 7 - Динамика изменения концентрации липокалина-2 моче у пациентов в течение 24 часов после кардиохирургических вмешательств.

*) достоверные различия между пациентами с ОПП (ОПП+) и без ОПП (ОПП-) в группе ($p < 0,05$)

**) достоверные различия между пациентами с ОПП в 1-й и 2-й группе ($p < 0,05$)

Во 2-й группе концентрация NGAL в моче у пациентов с ОПП и без ОПП достоверно повышалась через 2 часа, через 4 часа возвращалась к исходным значениям и оставалась на данном уровне через 24 часа после операции. Во 2-й группе достоверных различий в концентрации NGAL в моче у пациентов с ОПП и без ОПП выявлено не было. Максимальные различия концентрации NGAL у пациентов с ОПП и без ОПП были выявлены через 2 часа после операции в 1-й группе (рис. 7).

Результаты ROC-анализ

Анализ диагностической информативности маркеров был проведен с использованием ROC-анализа. Оценивали чувствительность и специфичность тестов, площадь под кривой (AUC) и отношение правдоподобий (LR).

В таблице 3 представлено сравнение диагностической эффективности методов по результатам ROC-анализа, из которой следует:

1. максимальных значений площадь под ROC-кривой у пациентов в 1-й группе для биомаркеров липокалин-2 и интерлейкин-18 достигает через 2 часа после операции – со значениями 0,817 и 0,980, соответственно, со снижением через 4 часа;
2. для гиалиновых цилиндров максимальное значение AUC (0,950) было обнаружено через 4 часа после операции;
3. для клеток почечного эпителия максимальное значение AUC (0,985) через 24 часа после операции.

Таблица 3 - Величина AUC исследованных маркеров острого повреждения почек после кардиохирургических вмешательств у пациентов 1-й группы

Маркеры	2 часа	4 часа	24 часа
	площадь под ROC-кривой		
Гиалиновые цилиндры	0,940	0,950	0,930
Клетки почечного эпителия	0,860	0,930	0,985
Интерлейкин-18	0,980	0,800	-
Липокалин-2	0,817	0,667	-

Лабораторный тест «клетки почечного эпителия», кроме высокого значения AUC (0,985) через 24 часа после операции, оценивая величину LR+ (20) и LR- (<0,01), указывает на хорошую способность диагностического теста распознавать наличие болезни и чрезвычайно высокую способность распознавать отсутствие болезни.

Причины различий аналитических характеристик данных могут быть обусловлены следующими факторами:

1. Клетки почечного эпителия. Органной и тканевой специфичностью маркера. Высокой органной специфичность обладают клетки почечного эпителия, поскольку они

выстилают почечные каналцы и у здоровых людей в моче практически отсутствует. Их появление в моче пациентов с ОПП следует объяснить тем, что выделение клеток почечного эпителия с мочой в обеих группах связано с активацией процессов перекисного окисления липидов, апоптозом клеток почечного эпителия, для завершения которого необходим определенный промежуток времени, с последующей потерей клетками связи с базальной мембраной и их попаданием («shedding») в мочу. Их появление в моче через 24 часа следует расценить как реакцию каналцев на операционный стресс.

2. Гиалиновые цилиндры. Напрямую они не являются специфичными для клеток почечного эпителия, их появление в моче обусловлено нарушением в них метаболических процессов в клетках каналцев, приводящих к внутритубулярному ацидозу и денатурацией белков, профильтровавшихся через почечный фильтр.

3. Интерлейкин-18 и липокалин-2. Несмотря на то, что оба биомаркера синтезируются в клетках почечного эпителия, повышение их концентрации в моче часто наблюдают у пациентов, находящиеся в критическом состоянии, и их попадание в кровь и в мочу из внепочечных источников.

ВЫВОДЫ

1. Количественный метод обнаружения элементов осадка мочи – гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия в счетной камере в режиме фазового контраста позволяет их использовать в качестве микроскопических маркеров острого повреждения почек в режиме реального времени у пациентов после кардиохирургических вмешательств.

2. Концентрация гиалиновых цилиндров в моче достигает максимального значения у пациентов с острым повреждением почек после кардиохирургических вмешательств через 4 часа, клеток почечного эпителия – через 24 часа после оперативного вмешательства в обеих группах. Уровень повышения гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия у пациентов со скоростью клубочковой фильтрации выше $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ достоверно выше их повышению у пациентов со скоростью клубочковой фильтрации от 50 до $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$.

3. Концентрация биохимических маркеров, интерлейкин-18 и липокалин-2, в моче у пациентов с острым повреждением почек после кардиохирургических вмешательств повышается через 2 часа после операции только у пациентов со скоростью клубочковой фильтрации выше $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$.

4. Гиалиновые цилиндры в качестве маркера острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических вмешательств через 4 часа (AUC 0,950) позволяют предсказать развитие острого повреждения почек, клетки почечного эпителия через 24 часа (AUC 0,985) после операции с чувствительностью 98% и специфичностью 95%.

5. Интерлейкин-18 (AUC 0,980) и липокалин-2 (AUC 0,817) в качестве маркеров острого повреждения почек после кардиохирургических вмешательств позволяют предсказать развитие острого повреждения почек через 2 часа после операции с чувствительностью 95% и 80% и специфичностью 90% и 75% соответственно.

6. Гиалиновые цилиндры, клетки почечного эпителия, интерлейкин-18, липокалин-2 в качестве маркеров острого повреждения максимальной информативностью обладают у пациентов, скорость клубочковой фильтрации которых до операции была выше $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$. У пациентов со скоростью клубочковой фильтрации от 50 до $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ AUC микроскопических маркеров не превышает 0,700. Различий в концентрации биохимических маркеров у пациентов с острым повреждением почек и без повреждения почек в данной группе выявлено не было.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать следующие практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики:

- При подсчете гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия в качестве маркеров острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических вмешательств, осадок мочи следует готовить стандартизованным методом, элементы мочи подсчитывать в счетной камере в режиме фазового контраста.

Для анестезиологов и кардиохирургов:

- Повышение интерлейкина-18 и липокалина-2 в моче через 2 часа, гиалиновых цилиндров – через 4 часа, клеток почечного эпителия – через 24 часа после операции у пациентов со скоростью клубочковой фильтрации выше $85 \pm 8,5 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ свидетельствует о наступлении острого повреждения почек через 24, 48 часов. Для пациентов со скоростью клубочковой фильтрации от 50 до $85 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ наиболее информативным маркером острого повреждения почек остается концентрация креатинина в сыворотке крови через 24, 48 часов после операции.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные результаты свидетельствуют в пользу проведения дальнейшего изучения возможности микроскопических маркеров (гиалиновых цилиндров и клеток почечного эпителия) выявлять острое повреждение почек у пациентов с другими заболеваниями и состояниями, при которых возможно развитие ОПП: сепсис, травмы, трансплантация почек, при проведении химиотерапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых российских научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

1. Птицына А.И. Микроскопия осадка мочи как экспресс-метод прогнозирования острого повреждения почек при кардиохирургических вмешательствах / А.И. Птицына, В.В. Слепышева, И.С. Курапеев, А.В. Козлов // Медицинский алфавит. – 2018. – Том 1 (Современная лаборатория) № 5. – С. 49-53.

2. Птицына А.И. Элементы осадка мочи и интерлейкин-18 при остром повреждении почек после кардиохирургических вмешательств [Электронный ресурс] / А.И. Птицына, И.С. Курапеев, А.В. Козлов // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2018. – №19. – С. 352-362. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom19/art26.html>.

3. Птицына А.И. Может ли липокалин-2 в моче кардиохирургических больных быть маркером острого повреждения почек при исходно нормальной скорости клубочковой фильтрации? / А.И. Птицына, И.Ю. Стюф, И.С. Курапеев, А.В. Козлов // Лабораторная служба. – 2020. – 9(1). – С. 78–83.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций

4. Птицына А.И. Сравнение клеточных элементов осадка мочи в нативных и суправитально окрашенных препаратах / П.А. Борисова, Д.В. Далинкина, А.И. Птицына // «Мечниковские чтения-2016»: Сборник материалов 89-й научной конференции студенческого научного общества. Часть 1. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2016 – С. 129.

5. Птицына А.И. Изучение осадка мочи у пациентов после аортокоронарного шунтирования / А.И. Птицына «Трансляционная медицина: от теории к практике»: Материалы 5-й научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2017 – С. 78-79.

6. Птицына А.И. Эозинофилурия у пациентов после кардиохирургических вмешательств / П.А. Борисова, Д.В. Далинкина, А.И. Птицына // «Мечниковские чтения-2017»: Сборник материалов 90-й научной конференции студенческого научного общества. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2017 – С. 77.

7. Птицына А.И. Изучение осадка мочи у пациентов после кардиохирургических вмешательств / А.И. Птицына, А.В. Козлов // Лабораторная Служба: Материалы III Российского конгресса лабораторной медицины. – М.: Изд-во Медиа Сфера, 2017. – Том 6, № 3 – С. 31.

8. Птицына А.И. Расчетные индексы интоксикации у кардиохирургических пациентов в раннем постоперационном периоде / А.И. Птицына, А.А. Васильева, К.Б. Галай,

Д.Ю. Морозов // «Мечниковские чтения-2018»: Сборник материалов 91-й научной конференции студенческого научного общества. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2018 – С. 179.

9. Птицына А.И. Количественный подсчет элементов осадка мочи у пациентов после кардиохирургических вмешательств / А.И. Птицына, И.С. Курапеев, А.В. Козлов // Лабораторная Служба: Материалы IV Российского конгресса лабораторной медицины. – М.: Изд-во Медиа Сфера, 2018. – Том 7, № 3 – С. 18.

10. Птицына А.И. Интерлейкин-18 и элементы осадка мочи в диагностике острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических вмешательств // А.И. Птицына, К.А. Богомолова, И.С. Курапеев, А.В. Козлов // Сборник тезисов XI Съезда Российского профсоюза медицинских работников экстракорпоральных технологий. – 2018. – С. 43-45.

11. Птицына А.И. Лабораторные маркеры острого повреждения почек у пациентов после кардиохирургических вмешательств / А.И. Птицына, И.С. Курапеев, А.В. Козлов // Материалы научно-практических конференций в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2019): сборник тезисов. – М.: ИПО «У Никитских ворот», 2019. – С. 41.

Список принятых сокращений

АГ	артериальная гипертензия
ЗПТ	заместительной почечной терапии
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИК	искусственное кровообращение
ИЛ-18	интерлейкин-18
ИФА	иммуноферментный анализ
КШ	коронарное шунтирование
ОПН	острая почечная недостаточность
ОПП	острое повреждение почек
ОРИТ	отделение реанимации и интенсивной терапии
СД	сахарный диабет
СКФ	скорость клубочковой фильтрации
ХБП	хроническая болезнь почек
ХОБЛ	хроническая обструктивная болезнь легких
CSI	cast scoring index, индекс подсчета цилиндров
IGFBP 7	insulin-like growth factor binding protein 7, белок 7 связывающий инсулиноподобный фактор роста
KDIGO	рабочая группа Kidney Disease Improving Global Outcomes
L-FABP	liver-type fatty acid-binding protein, печеночный белок, связывающий жирные кислоты
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin, липокалин-2, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, липокалин-2
TIMP-2	tissue inhibitor of metalloproteinases-2, тканевой ингибитор металлопротеиназы-2
UMS	urinary microscopy score, индекс счета осадка мочи