E' possibile utilizzare la determinazione della lipocalina associata alla gelatinasi dei neutrofili (NGAL) nella valutazione della nefrotossicità da bisfosfonati?*

Isabella Squarzoni[1], Claudio Cocco[2], Beatrice Caruso[2], Gabriella Righetti[2], Ombretta Viapiana[3], Cataldo Abaterusso[1], Antonio Lupo[1], Maria Stella Graziani[2]

[1]Nefrologia Clinica, [2]Laboratorio Analisi, [3]Unità di Reumatologia, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona

Caro Editore,

i bisfosfonati, inibitori dell'attività degli osteoclasti e della decostruzione scheletrica scoperti alla fine degli anni '60, sono ampiamente utilizzati nella terapia dell'osteoporosi e di altre patologie del metabolismo osseo, in particolare quelle caratterizzate da un aumento del riassorbimento osseo, quali il morbo di Paget, l'osteogenesi imperfetta, le metastasi ossee e l'osteolisi da mieloma multiplo (1, 2). Si tratta di farmaci nefrotossici che possono determinare insufficienza renale acuta (IRA) (3); in particolare l'acido zoledronico è associato a necrosi tubulare acuta. Durante la terapia con questi farmaci è pertanto necessario un attento controllo della funzionalità renale per poter riconoscere e trattare precocemente eventuali danni. La creatinina sierica, il marcatore di funzionalità renale più utilizzato anche in relazione al basso costo e alla sua ampia disponibilità, presenta ben note limitazioni, tra le quali la sua dipendenza dalla massa muscolare dell'individuo e quindi dall'età, dal sesso e dalla razza. Il limite maggiore è però rappresentato dalla velocità con cui aumentano le concentrazioni sieriche. Infatti nell'IRA la creatinina aumenta non prima di 24-48 ore dall'evento nefrolesivo, rischiando così di ritardare anche la terapia (4). La necessità di una diagnosi precoce, presupposto per un trattamento efficace, ha portato alla ricerca di nuovi marcatori sierici e urinari (5, 6). La "neutrophil gelatinase-associated lipocalin" (NGAL) è una delle più promettenti tra le molecole proposte, dato che precede di ore l'aumento della creatinina e di altri marcatori di danno renale, tanto da essere definita la "troponina renale" (5-8).

L'ipotizzata precocità di aumento di NGAL nel plasma e nelle urine in risposta al danno tubulare acuto ne fa un ottimo candidato a marcatore per predire e monitorare la comparsa di complicazioni renali nei pazienti in trattamento con farmaci potenzialmente nefrotossici quali i bisfosfonati. Questa lettera ha lo scopo di riferire un'esperienza preliminare sulla possibilità di utilizzare NGAL in questo particolare contesto clinico.

E' stata selezionata una coorte di 31 pazienti ambulatoriali, osteoporotici e con indicazioni cliniche al trattamento con bisfosfonati. Sono stati esclusi dalla partecipazione al protocollo di studio i pazienti con filtrato glomerulare renale (GFR) <30 mL/min. Il campione è risultato essere costituito da 30 femmine e 1 maschio, età massima 83 anni ed età minima 53 anni. I pazienti reclutati hanno fornito il loro Consenso Informato. Durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata e applicata la dichiarazione di Helsinki del 1975, come emendata nel 1996. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a trattamento infusivo ambulatoriale con zoledronato. Sono stati somministrati 5 mg di farmaco mediante un'infusione della durata di 20 min, a una velocità di 5 mL/min (100 gocce/min). Al tempo T0, ossia prima dell'infusione, al tempo T1 (dopo 5 ore dalla somministrazione del farmaco) e al tempo T2, corrispondente a 7 giorni dall'infusione, sono stati raccolti campioni ematici e urinari. I campioni sono stati centrifugati e il sovranatante conservato a -80 °C. Al termine dello studio, sono stati effettuati i seguenti esami ematici: NGAL, cistatina C, creatinina, e i seguenti esami urinari: NGAL, creatinina, albumina, α_1-microglobulina. NGAL plasmatica e urinaria erano misurate in tutti i pazienti ai tre tempi indicati; creatinina e cistatina C erano misurate su siero al tempo T0 e T2. Albumina e α_1-microglobulina urinarie sono state misurate nei pazienti che hanno presentato un valore NGAL urinario più elevato del limite superiore di riferimento. Per la misura di NGAL plasmatica era utilizzato il metodo Triage NGAL (Biosite Inc), un immunodosaggio a fluorescenza per una determinazione quantitativa rapida (~15-20 min). Il limite superiore di riferimento suggerito dal produttore è 149 μg/L, mentre l'intervallo misurabile dal metodo è compreso tra 60 e 1300 μg/L. Per la misura di cistatina C è stato utilizzato un metodo immunonefelometrico (Immage 800, Beckman Coulter), mentre la creatinina è stata misurata mediante il

**Questo lavoro è stato in parte presentato come poster all'IFCC WorldLab-EuroMedLab 2011, 15-19 maggio 2011, Berlino, Germania.*

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Piazzale Stefani 1, 37126 Verona. Tel. 0458122155, Fax 0458122970, E-mail mariastella.graziani@ospedaleuniverona.it

Ricevuto: 14.03.2011 Revisionato: 15.04.2011 Accettato: 15.04.2011

metodo al picrato alcalino con il sistema Dimension Vista (Siemens). Valori di creatinina <1,10 mg/dL e valori di cistatina C <1,50 mg/L sono stati considerati fisiologici. La misura di NGAL urinaria era eseguita su Architect (Abbott) con un immunodosaggio a chemiluminescenza; il limite superiore di riferimento suggerito dal produttore è 131,7 μg/L. Albumina e α_1-microglobulina su urine erano misurate su Immage 800 e i valori erano espressi in rapporto alla creatinina urinaria; i limiti superiori di riferimento per i due analiti sono 30 mg/g e 20 mg/g, rispettivamente.

Nessun valore di NGAL plasmatica è risultato >149 μg/L; non sono state rilevate concentrazioni patologiche nemmeno per cistatina C. Relativamente alla creatinina, è stato osservato un unico caso con un aumento superiore al 60% della creatininemia tra T0 (0,49 mg/dL) e T2 (0,80 mg/dL) (paziente 20). Nove pazienti hanno presentato valori di NGAL urinaria elevati (>131,7 μg/L) in una delle determinazioni a T0, T1 o T2 (Tabella 1). A parte il paziente 20, nessun aumento di NGAL urinaria era chiaramente riconducibile a un danno tubulare, in quanto le alterazioni di NGAL o erano già presenti al T0 o non erano accompagnate da analoghe alterazioni delle altre due proteine urinarie. Il valore di NGAL urinaria a T2 dell'unico paziente con aumento della creatininemia (paziente 20) non era particolarmente elevato, mentre le due proteine urinarie presentavano valori francamente patologici.

Se i bifosfonati siano farmaci nefrotossici è materia di dibattito; nell'osteoporosi la terapia con bisfosfonati richiede posologie sensibilmente minori e maggiori intervalli tra le dosi, rispetto a quelle utilizzate per il trattamento delle lesioni ossee litiche da metastasi o da neoplasie ossee primitive e questo si traduce molto probabilmente in una minore nefrotossicità del trattamento (9-11). Questa nostra esperienza preliminare sembra dimostrare che in questo contesto clinico la determinazione di NGAL non sembra utile per il monitoraggio della funzionalità renale, perché la misura su siero non si è modificata nell'unico paziente che ha presentato elevazione della creatininemia e quella urinaria era già aumentata in tre pazienti a T0 e in altri ai tempi T1 e T2, senza che si potesse osservare un concomitante aumento delle proteine urinarie.

La maggiore differenza tra questo lavoro e quelli che in letteratura hanno valutato NGAL come paramento di danno renale è che la maggior parte degli studi ha esaminato la comparsa di IRA come conseguenza di eventi patologici o chirurgici maggiori, come, ad esempio, stati setticemici, shock, interventi vascolari e cardiochirurgici, utilizzo di tossici a dosaggio elevato (mezzo di contrasto radiografico, chemioterapici), nei quali l'entità del danno renale è generalmente cospicua (8, 12-14). La spiegazione di alcuni aumenti "erratici" di NGAL urinaria che abbiamo osservato in questa limitata coorte di pazienti potrebbe essere ricercata in condizioni cliniche, come le infezioni urinarie, in grado di determinare alterazioni del valore di NGAL urinaria rendendone incerta l'interpretazione (15-17) . Potrebbe essere interpretato sotto questa luce il riscontro di valori elevati di NGAL urinaria in assenza di riduzione della funzione renale e di alterazione degli altri marcatori di danno tubulare, riscontrati in alcuni soggetti studiati. E' noto che NGAL sia una proteina sintetizzata e rilasciata in condizioni infiammatorie e questo potrebbe essere il fattore confondente.

In conclusione, questa esperienza, seppur preliminare e limitata, ha permesso, di evidenziare la difficoltà di utilizzare la misura di NGAL urinaria in questo specifico contesto, stante il riscontro di valori elevati della proteina in pazienti che non presentavano alcun altro segno di danno renale acuto.

Tabella 1

Parametri urinari misurati nei 9 pazienti con lipocalina associata alla gelatinasi dei neutrofili (NGAL) urinaria elevata. I valori di albumina (Alb) e di α_1-microglobulina (A1M) urinarie sono espressi in rapporto alla creatinina (Cr). Per i limiti superiori di riferimento fare riferimento al testo

Paziente no.	T0				T1				T2			
	NGAL (μg/L)	Cr (g/L)	Alb/Cr (mg/g)	A1M/Cr (mg/g)	NGAL (μg/L)	Cr (g/L)	Alb/Cr (mg/g)	A1M/Cr (mg/g)	NGAL (μg/L)	Cr (g/L)	Alb/Cr (mg/g)	A1M/Cr (mg/g)
3	18,2	1,1	15	27,5	10,7	1,1	12	17,8	143,7	0,5	7	23,8
6	113,6	1,7	9	4,6	141,1	1,2	9	4,2	19,3	1,2	4	ND
8	7,8	1,0	4	7,4	33,2	1,0	6	7,2	385,3	0,7	4	8,3
11	408,3	1,1	19	5,5	184,9	0,5	12	ND	4,0	0,7	18	ND
15	239,3	1,2	19	7,3	15,3	0,1	ND	ND	10,7	1,1	17	4,8
16	37,5	1,1	5	ND	6,0	0,2	ND	ND	252,7	0,8	4	ND
20	60,1	0,9	8	18,3	44,5	0,4	11	19,8	155,2	1,2	861	211,7
24	451,7	0,7	12	ND	539,5	0,9	13	5,0	972	0,9	27	8,0
28	3,3	0,5	6	22,8	44,4	0,4	ND	11,3	141,5	0,7	11	19,7

ND, valore non calcolabile per concentrazioni di A1M o Alb inferiori al limite di rilevabilità della misura.

BIBLIOGRAFIA

1. Delmas PD, Adami S, Strugala C, et al. Intravenous ibandronate injections in postmenopausal osteoporosis: one year findings from the DIVA study. Arthritis Rheum 2006;54:1838-46.
2. Black DN, Delmas PD, Eastell R, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. N Engl J Med 2007;356:1809-22.
3. Perazella MA, Markowitz GS. Bisphosphonates nephrotoxicity. Kidney Int 2008;74:1385-93.
4. Dalton RN. Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality. Clin Chem 2010;56:687-9.
5. Ronco C. N-GAL: diagnosing AKI as soon as possible. Crit Care 2007;11:173.
6. Milani P, Graziani MS, Merlini G. Marcatori biochimici di danno renale. Biochim Clin 2010;34:585-90.
7. Devarajan P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. Nephrology 2010;15:419-28.
8. Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. J Am Soc Nephrol 2003;14:2534-43.
9. Zojer N, Keck V, Pecherstorfer M. Comparative tolerability of drug therapies for hypercalcemia of malignancy. Drug Saf 1999;21:389-406.
10. Chang JT, Green L, Beitz J. Renal failure with use of zoledronic acid. N Engl J Med 2003;349:1676-8.
11. Reid IR, Brown JP, Burckhardt P, et al. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. N Engl J Med 2002;346:653-61.
12. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. Lancet 2005;365:1231-8.
13. Hrisch R, Dent C, Pfriem H, et al. NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropaty in children. Pediatr Nephrol 2007;22:2089-95.
14. Mishra J, Ma Q, Kelly C, et al. Kidney NGAL is a novel early biomarker of acute injury following transplantation. Pediatr Nephrol 2006;21:856-63.
15. Soni SS, Cruz D, Bobek I, et al. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other sistemic conditions. Int Urol Nephrol 2010;42:141-50.
16. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron. Nature 2004;432:917-21.
17. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. Mol Cell 2002;10:1033-43.