

ARTICOLI ORIGINALI

Correlazione Genotipo-Fenotipo in ADPKD: possibile utilità di NGAL?



Grazia Maria Virzi^{1,2}, Fiorella Gastaldon^{2,3}, Valentina Corradi^{2,3}, Massimo de Cal^{2,3}, Dinna N. Cruz^{2,3}, Maurizio Clementi¹, Claudio Ronco^{2,3}

(1) Unità di Genetica Clinica Epidemiologica, Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, Università degli Studi di Padova

(2) IRRIV-International Renal Research Institute Vicenza

(3) Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale "San Bortolo" Vicenza

Abstract

INTRODUZIONE: La malattia autosomica dominante del Rene Policistico (ADPKD) è una malattia monogenica tra le più frequenti nell'uomo; ha penetranza variabile età-dipendente ed è geneticamente e clinicamente eterogenea con ampia variabilità a livello inter-familiare ed intra-familiare. Lo scopo principale di questo lavoro è quello di valutare il livello plasmatico di NGAL in pazienti ADPKD con genotipo noto per indagare la presenza di un'eventuale correlazione genotipo-fenotipo.

METODI: Sono state arruolate 18 famiglie con aplotipo malattia associato a *PKD1*. Per ciascuna famiglia, sono stati selezionati un soggetto in Terapia Renale Sostitutiva (*PKD1_TRS*), almeno un soggetto con *PKD1* in stadio II-III (*PKD1_AMB*) e un soggetto *wild type* (*PKD1_WT*) con ecografia e analisi molecolare negative. Inoltre, sono stati arruolati anche 30 controlli sani (*CTR*) che non presentavano gradi di parentela con i soggetti in analisi. Sono stati inclusi anche 12 pazienti con *linkage* associato a *PKD2* e mutazione nota. Per ogni soggetto arruolato, sono stati determinati i livelli plasmatici di NGAL, Cistatina C (CysC) e la funzionalità renale.

RISULTATI: Come per Creatinina e Urea, il livello plasmatico di NGAL e CysC è significativamente maggiore in *PKD1_TRS* rispetto a *CTR* (60 pg/mL, IQR 60-61) ($p < 0,001$). Questo gruppo di pazienti risulta avere valori plasmatici incrementati di NGAL (611 pg/mL, IQR 537-676) e CysC 6,1 mg/L, IQR 5,6-6,4), rispetto ai soggetti *PKD1_AMB* (NGAL: 86 pg/mL, IQR 60-109; CysC: 0,8 mg/L, IQR 0,7-1,1) e *PKD1_WT* (NGAL: 60 pg/mL, IQR 60-61; CysC 0,7, IQR 0,6-0,8) provenienti dalle stesse famiglia. Tuttavia, i soggetti *PKD1_AMB* evidenziano valori plasmatici aumentati per tutti e quattro i parametri analizzati confrontati con *PKD1_WT* e *CTR*. I pazienti *PKD1_AMB*, anche se più giovani, presentano NGAL, CysC, Urea e Cr maggiore rispetto ai loro consanguigni *wild type*. I soggetti *wild type* e i *CTR* hanno valori di Cr, Urea, NGAL e CysC simili ($p > 0,05$). Tra i 41 pazienti in stadio II-II ma con diversa mutazione genetica, non esiste una sostanziale differenza né nel valore di NGAL né in quello di CysC tra pazienti con mutazione in *PKD1* e in *PKD2*, almeno in questa fascia di funzionalità renale.

CONCLUSIONI: In conclusione, possiamo affermare che questo è il primo studio che valuta NGAL in funzione del genotipo ADPKD, affiancando un'analisi biochimica a quella genetica. I nostri risultati evidenziano che i soggetti *wild type* sono dei controlli migliori rispetto a comuni *CTR*, perché hanno valori di NGAL e CysC totalmente sovrapponibili a questi ultimi, ma condividendo con i loro consanguigni affetti parte del patrimonio genetico. I valori di NGAL misurati nei pazienti con ADPKD in stadio II-III non ci permettono di distinguere pazienti con mutazioni in *PKD1* da pazienti con mutazione in *PKD2*.

Parole chiave: ADPKD, biomarcatori, correlazione genotipo-fenotipo, NGAL

Abstract

BACKGROUND: Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common genetic cause of chronic kidney disease (CKD) in adults. It is associated with both inter- and intra- familial variability, which can be explained by genetic heterogeneity, modifier genes and a genetic background. NGAL, a 25-kDa protein released from tubular cells after harmful stimuli, is a new biomarker. Recent studies suggest a possible role for NGAL in CKD. The aim of this study was to investigate NGAL in the context of genotype-phenotype correlation in ADPKD.

METHODS: We measured plasma NGAL, creatinine (Cr), and urea in 18 ADPKD patients on dialysis (PKD1_TRS), 29 of their relatives with CKD stage II-III (PKD1_AMB), 33 wild-type relatives (PKD1_WT), 12 subjects in CKD stage II-III with confirmed mutation in PKD2 and 30 healthy controls (CTR). Cr, urea and CysC were measured according to standard methods. Plasma NGAL was measured using point-of-care test. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated with a 4-variable standardized-MDRD formula.

RESULTS: Plasma NGAL, CysC, Cr and urea levels in PKD1_TRS were significantly higher than CTR (all with $p < 0.001$). PKD1_TRS pts had significantly higher NGAL, CysC, Cr and Urea levels compared to PKD1_AMB and PKD1_WT. PKD1_AMB pts had higher NGAL, CysC, Urea and Cr levels compared to PKD1_WT relatives. NGAL CysC, Cr and urea values were similar between PKD1_WT and CTR ($p > 0.05$). NGAL levels were not significantly different in ADPKD patients in CKD stage II-III with mutation in PKD1 or PKD2 (86 pg/mL, IQR 60-109 vs 82 pg/mL, IQR 63-169). NGAL correlated well (all with $p < 0.001$) with CysC ($r = 0.95$), Cr ($r = 0.89$), urea ($r = 0.76$) and inversely with eGFR ($r = -0.81$). A strong correlation between CysC and residual renal function was observed (CysC/eGFR: $r = -0.86$; CysC/Cr: $r = 0.7$; CysC/Urea: $r = 0.79$, all with $p < 0.001$).

CONCLUSION: This is the first study to evaluate plasma NGAL in the context of genotype-phenotype correlation. In ADPKD, NGAL levels were higher in patients already on Renal Replacement Therapy (RRT) compared to their affected relatives not on RRT. WT relatives had normal NGAL and CysC levels: these could be considered a better CTR group because they share the same genetic background with ADPKD subjects. No differences were found in NGAL levels between PKD1 and PKD2 patients in CKD stage II-III. Furthermore, the results indicate that NGAL correlates closely with renal function and CysC levels.

Key words: biomarkers, genotype-phenotype correlation

Introduzione

La malattia autosomica dominante del Rene Policistico (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ADPKD) è una malattia monogenica tra le più frequenti nell'uomo con incidenza di circa 1:1000 nati vivi [1]. ADPKD è caratterizzata dalla formazione di numerose cisti contenenti liquido a livello dei tubuli renali in entrambi i reni. Queste cisti aumentano progressivamente in numero e dimensioni e causano insufficienza renale cronica che comporta, nella maggior parte dei casi, la necessità di una terapia renale sostitutiva [1]. Il processo di cistogenesi comprende molteplici meccanismi come un'incontrollata proliferazione cellulare, un'insolita secrezione di fluido verso il lume delle cisti, il rimodellamento cellulare, l'incapacità dell'epitelio cistico di mantenere la polarità, l'incremento dell'apoptosi e la proliferazione cellulare [2].

La malattia policistica dell'adulto è caratterizzata da eredità autosomica dominante, da un esordio tardivo, manifestandosi solitamente nell'età adulta (terza-quinta decade di vita); ha penetranza variabile età-dipendente ed è geneticamente e clinicamente eterogenea [3]. Le ricerche hanno condotto all'identificazione e al sequenziamento di due geni coinvolti nella malattia: PKD1, identificato sul braccio corto del cromosoma 16 nella regione 13.3 e PKD2, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 4 nella regione 21 [4] [5]. In generale, i pazienti con mutazioni a carico di PKD2 presentano i sintomi più tardivamente e hanno mediamente una progressione verso l'insufficienza renale più lenta [6].

L'età di insorgenza della malattia, la gravità e il decorso clinico della stessa hanno una variabilità molto ampia in soggetti diversi, tra famiglie diverse (variabilità inter-familiare) e perfino tra membri di una stessa famiglia (variabilità intra-familiare) che quindi condividono la stessa mutazione germinale. L'ADPKD è caratterizzata da una così ampia variabilità fenotipica che può essere diagnosticata in utero attraverso la presenza di reni cistici e molto ingranditi o in anziani con funzione renale adeguata per un riscontro accidentale [7] (full text). Tutto ciò rende molto difficile un campionamento completo degli individui ADPKD e fa ipotizzare che le diverse manifestazioni della malattia siano condizionate, oltre che dal danno genetico primario, anche da una combinazione di fattori ambientali e di fattori genetici in grado di influenzare severità, insorgenza e decorso clinico della malattia [8] (full text).

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) è una proteina di 178 amminoacidi con una massa molecolare di 25KDa; appartiene alla famiglia proteica delle lipocaline e si lega in modo covalente alla gelatinasi prodotta dai neutrofili [9] [10].

Nell'uomo NGAL è fisiologicamente espresso e prodotto a livelli molto bassi in numerosi tessuti inclusi reni, stomaco, polmoni e colon [9]. L'espressione di questa proteina risulta marcatamente aumentata negli epitelii in risposta a numerosi stimoli dannosi; in particolar modo, risulta essere una delle molecole più precocemente espressa dalle cellule tubulari renali dopo danni di varia natura (cisplatino, ischemia/refusione, infezioni ed infiammazione) [11] (full text) [12] ed è, quindi, un formidabile strumento per la diagnosi di danno renale acuto (AKI) [12] [13] (full text) [14] [15].

Alcuni recenti studi suggeriscono un possibile ruolo di NGAL nelle patologie renali croniche: la produzione di NGAL da parte delle cellule tubulari potrebbe riflettere l'entità del danno renale cronico [16] [17] [18] (full text) [19].

Lo scopo principale di questo lavoro è quello di valutare il livello plasmatico di NGAL in pazienti ADPKD con genotipo noto per indagare la presenza di un'eventuale correlazione genotipo-fenotipo. Secondariamente, lo studio si propone di investigare il ruolo e l'eventuale uso nella clinica nefrologica di NGAL come marcatore renale specifico nella malattia policistica renale, studiandone la correlazione con creatinina, Urea e estimated Glomerular Filtration Rate (eGRF) e con Cistatina C (CysC).

Materiali e metodi

Pazienti e Protocollo di Studio

Nella prima fase dello studio sono state prese in considerazione 18 famiglie ADPKD tra quelle coinvolte nel protocollo di ricerca su ADPKD attivo dal 2007 presso il Dipartimento Interaziendale di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale di Vicenza. Le 18 famiglie incluse nell'analisi erano state precedentemente analizzate, nel nostro laboratorio, dal punto di vista genetico mediante l'analisi di *linkage* con specifici marcatori microsatellite (STR) e riportavano un aplotipo molecolare associato al gene *PKD1* [20] [21].

Per ciascuna famiglia *PKD1*, si sono selezionati un soggetto in Terapia Renale Sostitutiva (*PKD1_TRS*), almeno un soggetto con *PKD1* in stadio II-III (*PKD1_AMB*) e un soggetto *wild type* (*PKD1_WT*) con ecografia e analisi molecolare negative. Inoltre, sono stati arruolati anche 30 controlli sani (*CTR*) che non presentavano gradi di parentela con i soggetti in analisi. Si è cercato di selezionare i membri della stessa famiglia in modo che avessero caratteristiche il più possibile sovrapponibili (età confrontabili, stessa percentuale di soggetti di sesso maschile e femminile, etc.). I soggetti ADPKD trapiantati sono stati esclusi dallo studio.

Per la seconda fase, che si è concentrata sull'analisi dell'utilità di NGAL nei pazienti ADPKD in stadio II-III, seguiti regolarmente nel nostro ambulatorio dedicato, si sono inclusi nello studio 12 pazienti con *linkage* associato a *PKD2* e mutazione nota nel gene.

Il protocollo e il consenso informato sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza (N. 47/0). Ogni partecipante allo studio ha potuto leggere, prendere coscienza della natura della ricerca, compilare e firmare il modulo di consenso informato. Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato al trattamento dei dati genetici in forma anonima per scopi scientifici.

Raccolta dei Campioni di Sangue

Per ogni soggetto, sono stati raccolti 4 ml di sangue venoso periferico anti coagulato con EDTA per la misurazione di NGAL, CysC e per la stima della funzione renale. Il sangue raccolto è stato prontamente processato ed il plasma è stato opportunamente conservato a -80° C fino al momento dell'utilizzo.

Valutazione dei Parametri Biochimici della Funzionalità Renale

Per ogni paziente è stato valutato il livello di creatinina (Cr), Urea nel plasma ed è stato calcolato l'eGFR. I livelli di Cr e Urea, nella popolazione in analisi, sono stati valutati tramite dosaggio enzimatico presso il Laboratorio di Nefrologia dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza; eGFR è stato calcolato tramite la formula a 4 variabili MDRD (*4-variable standardized- Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study equations*) [22].

Dosaggio del livello plasmatico di NGAL

Il livello di NGAL nel plasma è stato misurato attraverso il Triage® NGAL Test (Alere, San Diego, USA). Il Triage® NGAL Test è un immunodosaggio a fluorescenza *point-of-care testing* (POCT) per una determinazione quantitativa e rapida della concentrazione di NGAL in campioni di plasma o sangue intero trattati con EDTA.

Il dispositivo Triage® NGAL Test è una cartuccia monouso che si avvale dell'uso di anticorpi murini monoclonali e di anticorpi policlonali diretti contro NGAL, coniugati a nanoparticelle fluorescenti e immobilizzate sulla fase solida di plastica di un apposito sostegno (metodo immunometrico fluorescente in fase solida). Il dosaggio di NGAL si basa sull'intensità della fluorescenza rilevata dal misuratore Triage® Meter all'interno di una particolare area di misurazione sul dispositivo di analisi. La concentrazione di NGAL nel campione risulta direttamente proporzionale all'intensità della fluorescenza rilevata dal misuratore. Il range di NGAL riportato dal sistema di analisi è compreso tra i 60 ng/mL e 1300 ng/mL e la durata complessiva dell'analisi è di circa 15 minuti per campione. La procedura di analisi prevede solamente l'aggiunta di alcune gocce di campione all'apposito pozzetto presente sul dispositivo Triage® NGAL Test. Dopo l'aggiunta del campione, questo reagisce con i coniugati anticorpali e scorre lungo il dispositivo di analisi per azione capillare. La presenza dell'analita nel campione impedisce ai coniugati fluorescenti di legarsi alla fase solida della zona di rilevazione, in modo tale che la concentrazione dell'analita sia correlata in modo inverso alla fluorescenza rilevata. Il misuratore è programmato per eseguire automaticamente l'analisi solo dopo la reazione tra campione e reagenti all'interno del dispositivo [23].

Dosaggio del livello plasmatico di Cistatina C

Il dosaggio del livello plasmatico di CysC è stato effettuato mediante l'uso mediante "ST AIA-PACK *Cystatin C*" (TOSOH BIOSCIENCE, INC., San Francisco, CA, USA), metodo immunoenzimatico a due siti realizzato in specifiche coppette di reazione incluse nel kit. La CysC, pre-

sente nel campione, si è legata all'anticorpo monoclonale immobilizzato sulle sfere magnetiche comprese nel kit e all'anticorpo monoclonale con marcatura enzimatica presente nella coppetta di reazione. Le sfere magnetiche sono state, poi, lavate per rimuovere gli anticorpi monoclonali liberi marcati e, quindi, incubati con un substrato fluorogenico. La quantità di anticorpo monoclonale coniugato alle sfere è direttamente proporzionale alla concentrazione di CysC presente nel campione testato.

La quantificazione di CysC nei campioni testati è stata realizzata seguendo il protocollo e le istruzioni fornite dalla ditta fornitrice. La concentrazione di CysC (mg/mL) è stata calcolata basandosi sulla curva di calibrazione e utilizzando gli analizzatori Tosoh AIA: questi analizzatori leggono il livello di fluorescenza generata dalla reazione e lo convertono automaticamente nella concentrazione di CystC.

Analisi Statistica

L'analisi statistica dei dati è stata realizzata tramite il Software Statistico SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Le variabili categoriche sono state espresse in percentuale; le variabili continue, se parametriche, sono state riportate come media \pm deviazione standard e, se non-parametriche, come mediana e intervallo di interquartile (IQR). Per la valutazione e la comparazione tra due gruppi, si è applicato il Test-t di Student's per le distribuzioni normali e il Test-U di Mann-Whitney per i dati distribuiti in maniera non gaussiana; mentre per il confronto e la comparazione multipla dei dati tra tre o più gruppi il test ANOVA o il test Kruskal-Wallis, a seconda del più appropriato al caso. Il coefficiente di Pearson è stato applicato per valutare la correlazione tra variabili.

Un *p*-value inferiore a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Caratteristiche dei soggetti ADPKD arruolati nello studio

Nella tabella 1, vengono riportati i dati clinici e le caratteristiche demografiche dei pazienti selezionati dalle 18 famiglie *PKD1-linkage* associate inclusi nella prima parte dello studio (Tabella I). L'età media dei 18 pazienti *PKD1_TRS* è risultata di $60,4 \pm 10,0$ anni e il 55% dei soggetti arruolati era di sesso maschile. Nel gruppo *PKD1_TRS*, il valore mediano della Cr era di 8,8 mg/dL (6,9-10,2) e quello di Urea era di 127 mg/dL (109-141). All'interno di questo gruppo, l'83,3% dei pazienti presentava ipertensione e il 16,7% riportava nella propria anamnesi episodi di nefrolitiasi.

All'interno delle 18 famiglie *PKD1-linkage* associate sono stati selezionati 29 individui, seguiti regolarmente dal nostro ambulatorio con funzionalità renale in stadio II-III (*PKD1_AMB*). L'età media del gruppo di pazienti *PKD1_AMB* è risultata di $53,9 \pm 13,6$ anni. Il 58% dei soggetti

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti *PKD1-linkage* associati.

	PKD1_TRS	PKD1_AMB	PKD1_WT
Età	60.42 \pm 10.03	53.19 \pm 13.6	57.27 \pm 13.96
Sesso	10M/8F	17M/12F	15M/18F
Diabete Mellito	20%	12,5%	6%
Ipertensione	83,3%	85,71%	18.2%
Episodi di Nefrolitiasi	16,7%	14,29%	3,3%
Altri Organi Cistici	80%	60%	—

facenti parte di questo gruppo era di sesso maschile. In questo gruppo, il valore mediano della Cr era di 1,1 mg/dL (0,8-2) e quello di Urea era di 64 mg/dL (38-72). All'interno di questo gruppo, il 18,2% dei pazienti presentava ipertensione e il 3,3% riportava nella propria anamnesi episodi di nefrolitiasi.

Il gruppo dei soggetti *PKD1-WT*, selezionati dalle 18 famiglie in analisi, risulta costituito da 33 individui; l'età media di questo gruppo con ecografia e *linkage* negativo per l'aplotipo malattia è risultata di 57,3 ± 14,0 anni. Il 45,4% *PKD1-WT* era di sesso maschile. Nel gruppo *PKD1-WT*, il valore mediano della Cr era di 0,8 mg/dL (0,8-0,9) e quello di Urea era di 33 mg/dL (30-38). All'interno di questo gruppo, l'85,7% dei pazienti presentava ipertensione e il 14,3% riportava nella propria anamnesi episodi di nefrolitiasi.

Sono stati, inoltre, arruolati 12 pazienti con *linkage* associato a *PKD2* e con mutazione nota in questo locus, seguiti presso il nostro ambulatorio. Questi soggetti *PKD2* presentavano un'età media di 50,4 ± 11,5 anni ed il 66% era di sesso maschile. Il valore mediano di Cr era di 1,0 mg/dL (0,9-1,6) e il valore mediano di Urea era di 36 mg/dL (29-57). 65% dei soggetti *PKD2* presentava ipertensione e il 9% riportava nella propria anamnesi episodi di nefrolitiasi.

NGAL: Correlazione Genotipo-Fenotipo

Per studiare il ruolo di NGAL nella malattia policistica, abbiamo misurato il livello di questo biomarcatore in 18 famiglie con *linkage* associato con *PKD1*.

La tabella 2 riporta i livelli plasmatici di Cr, Urea, NGAL e CysC misurati nei gruppi in esame.

Come per Cr e Urea, il livello plasmatico di NGAL e CysC è significativamente maggiore nei soggetti *PKD1_TRS* rispetto a CTR (60pg/mL, IQR 60-61) ($p < 0,001$).

Questo gruppo di pazienti risulta avere valori plasmatici incrementati di NGAL (611 pg/mL, IQR 537-676) e CysC 6,1mg/L, IQR 5,6-6,4), rispetto ai soggetti *PKD1_AMB* (NGAL: 86 pg/mL, IQR 60-109; CysC: 0,8 mg/L, IQR 0,7-1,1) e *PKD1_WT* (NGAL: 60 pg/mL, IQR 60-61; CysC 0,7, IQR 0,6-0,8) provenienti dalle stesse famiglia. Tuttavia, i pazienti *PKD1_AMB* evidenziano valori plasmatici aumentati per tutti e quattro i parametri analizzati, quando paragonati con soggetti *PKD1_WT* e con i CTR (tabella 2). Come atteso, i soggetti *PKD1_AMB*, anche se più giovani, presentano Urea e Cr maggiore rispetto ai loro consanguigni *wild type* (Cr: 1,1 mg/dL, IQR 0,8-1,5 vs 0,8 mg/dL, IQR 0,8-0,9; Urea: 40 mg/dL, IQR 34-73 vs IQR 33-38). In particolar modo, in questo sottogruppo, anche i livelli plasmatici di NGAL e CysC risultano aumentati in confronto ai livelli rilevati per i loro consanguigni *wild type* (figura 1). Inoltre, dall'analisi dettagliata dei soggetti in ambulatorio risulta che i 13 soggetti con eGFR inferiore a 60 ml/min/1,73m², hanno livelli di NGAL superiori rispetto ai soggetti con eGFR superiore a 60 ml/min/1,73m² (mediana 138 versus 60 pg/ml, $p = 0,01$).

Confrontando, invece, la popolazione *wild type* e la popolazione CTR si può notare come i valori di Cr, Urea, NGAL e CysC siano simili in questi due gruppi ($p > 0,05$). Dai dati sopra ri-

Tabella 2. Livelli plasmatici di Cr, Urea, NGAL e CysC e valutazione di eGFR nei quattro gruppi in analisi.

	PKD1_TRS	PKD1_AMB	PKD1_WT	CTR	p-value
Cr (mg/dL)	8,8 (6,9-10,2)	1,1 (0,8-1,5)	0,8 (0,8-0,9)	0,8 (0,8-0,9)	<0,001
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	—	64 (38-72)	79 (71-89)	79 (71-90)	0,003
Urea (mg/dL)	127 (109-141)	40 (34-73)	33 (30-38)	32 (30-38)	<0,001
NGAL (pg/mL)	611 (537-676)	86 (60-109)	60 (60-61)	60 (60-61)	<0,001
CysC (mg/L)	6,1 (5,6-6,4)	0,8 (0,7-1,1)	0,7 (0,6-0,8)	0,7 (0,6-0,8)	<0,001

potati risulta che i soggetti *wild-type*, appartenenti a famiglie ADPKD, hanno valori di NGAL e CysC normali.

In aggiunta, abbiamo valutato anche la relazione esistente tra i valori di NGAL e i parametri solitamente usati per la valutazione della funzionalità renale e la CysC (tabella 3).

Si può notare come il livello di NGAL correli molto bene con il valore della CysC ($r = 0,95$), con il livello di Cr ($r = 0,89$) e di Urea ($r = 0,76$), mentre correla in maniera inversamente proporzionale con eGFR ($r = -0,81$) (per tutti $p < 0,001$). Inoltre, è stata osservata una correlazione molto forte tra il valore di CysC e la funzione renale residua (CysC/eGFR: $r = -0,86$; CysC/Cr: $r = 0,7$; CysC/Urea: $r = 0,79$, tutti con $p < 0,001$).

L'analisi genetica, effettuata nel nostro laboratorio, ci ha permesso di dividere i 41 soggetti ADPKD in stadio II-III in pazienti con mutazione associata a *PKD1* o *PKD2* pazienti. Confrontando i pazienti *PKD1* con quelli *PKD2*, non esiste una sostanziale differenza né nel valore di NGAL (*PKD1*: 86 pg/mL, IQR 60-109 vs *PKD2*: 82 pg/mL, IQR 63-169) (figura 2) né in quello di CysC (*PKD1*: 0,8 mg/L, IQR 0,7-1,1 vs *PKD2*: 0,9 mg/L, IQR 0,8-1,2) (tabella 4).

Discussione e conclusioni

Il preciso meccanismo molecolare e cellulare che porta dalle mutazioni nei geni *PKD* alla malattia non è ancora interamente noto e si può ipotizzare che coinvolga molteplici compo-

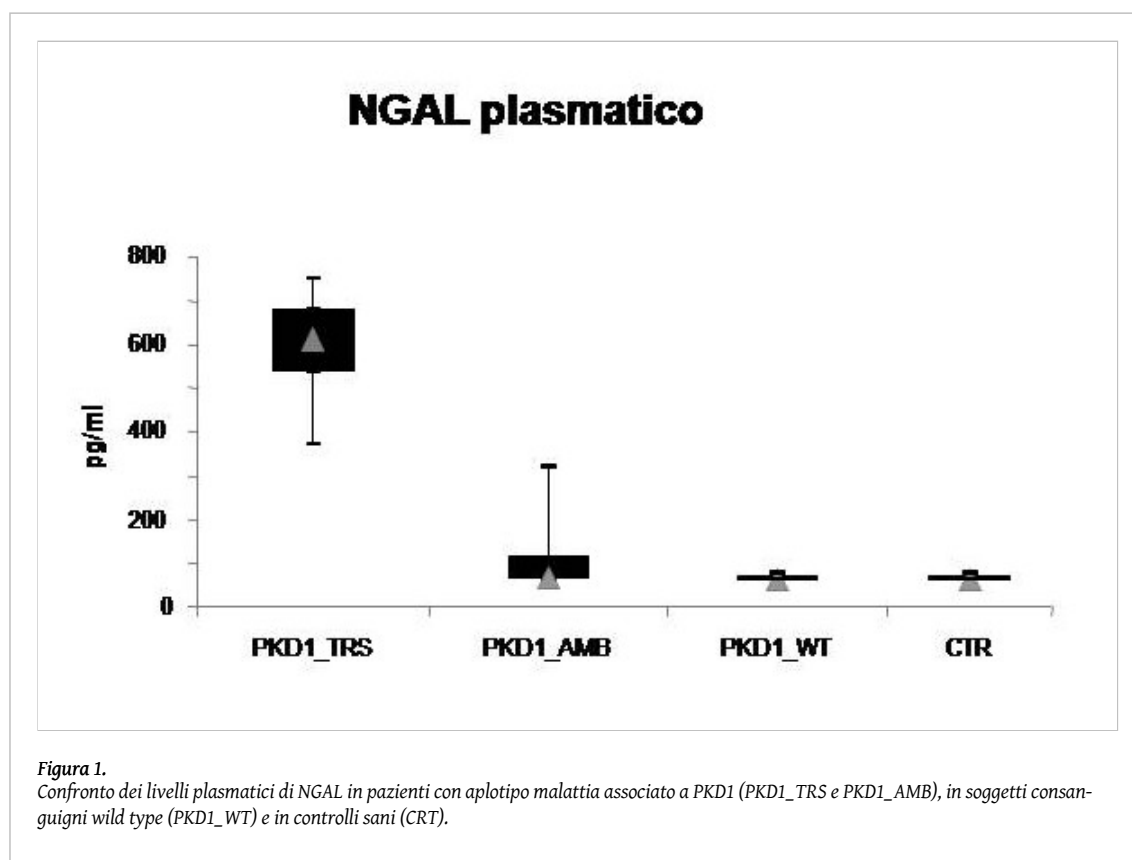


Tabella 3. Analisi di Correlazione di NGAL con Cr, eGFR, Urea, e CysC.

	Cr	eGFR	Urea	CysC
NGAL	$r = 0,89$ $p < 0,001$	$r = -0,81$ $p < 0,001$	$r = 0,76$ $p < 0,001$	$r = 0,95$ $p < 0,001$

nenti come altre proteine tubulari, citochine e fattori di crescita [19]. Alcuni studi, inoltre, suggeriscono un possibile ruolo di NGAL nelle patologie renali croniche: la produzione di NGAL da parte delle cellule tubulari potrebbe riflettere l'entità del danno renale cronico; questo biomarcatore potrebbe, quindi, rivestire un ruolo prognostico per il peggioramento della funzione renale in pazienti con nefropatie croniche [18] (full text) [24] [25].

Negli ultimi anni, sono stati realizzati molteplici studi su molecole da utilizzare come biomarcatori della funzionalità renale. Purtroppo, fino ad ora, nei pazienti con ADPKD, solo pochi biomarcatori molecolari sono stati studiati ed investigati per la loro utilità nella malattia. In un recente studio, Meijer e colleghi hanno studiato svariati biomarcatori urinari escreti da differenti segmenti dei nefroni nei pazienti policistici confrontandoli con soggetti sani. Nel suo lavoro, Meijer ha preso in considerazione e studiato le immunoglobuline G urinarie (uIgG) come marcatore connesso con il danno glomerulare; β_2 -microglobulina urinaria (uB2M), Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1), N-acetil- β -D-glucosammide (NAG), NGAL come marcatori del danno del tubulo prossimale e *Heart-type Fatty Acid Binding Protein* (HFABP) come marcatore del danno a livello del tubulo distale. In aggiunta, sono stati considerati anche MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) e MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) come marcatori di infiammazione. La proteina MCP-1 è stata studiata, anche dal gruppo di Grantham per meglio indagare la sua anomala espressione nella malattia po-

Tabella 4. Età e livelli plasmatici di Cr, Urea, NGAL e CysC in pazienti ADPKD in stadio II-III con genotipo noto (PKD1=29; PKD2=12).

	PKD1	PKD2
Età	53,19 \pm 13,6	50,4 \pm 11,5
Cr (mg/dL)	1,1 (0,8-1,5)	1,0 (0,9-1,6)
Urea (mg/dL)	40 (34-73)	36 (29-57)
NGAL (pg/mL)	86 (60-109)	82 (63-169)
CysC (mg/L)	0,8 (0,7-1,1)	0,9 (0,8-1,2)

NGAL plasmatico in pazienti PKD1 e PKD2 in ambulatorio

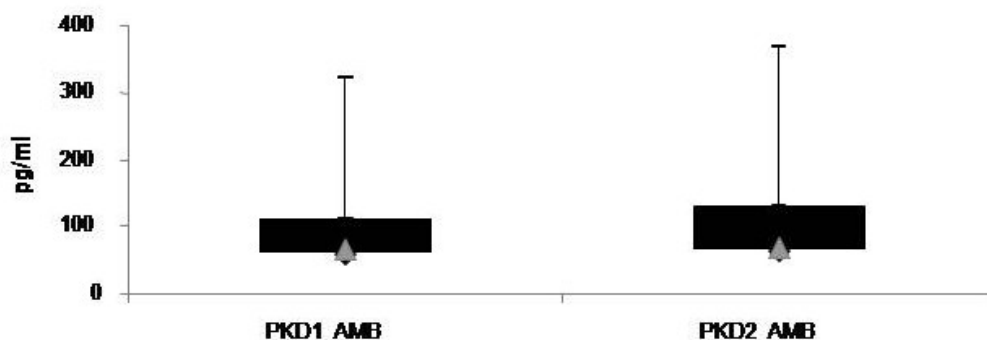


Figura 2. Confronto dei livelli plasmatici di NGAL in pazienti in stadio IIIII con mutazione in PKD1 O PKD2.

licistica [26] (full text). In ogni caso, i livelli di tutti questi biomarcatori, provenienti da differenti segmenti del nefrone, sono risultati aumentati nei pazienti policistici rispetto a soggetti sani sovrapponibili per età e sesso. Nel dettaglio, l'escrezione dell'ulgG è risultata incrementata e l'effettivo flusso sanguigno renale (*effective renal blood flow*, ERBF) e il filtrato glomerulare misurato (mGFR) sono risultati associati con l'escrezione urinaria di uB2M, NGAL, HFABP in modo indipendente dall'escrezione dell'albumina; inoltre, il volume totale renale è risultato correlato con KIM-1, NGAL e MCP-1 indipendentemente dall'escrezione dell'albumina. Gli autori hanno, quindi, concluso che, in aggiunta al rilevamento dell'escrezione urinaria dell'albumina, uB2M, KIM-1, H-FABP, MCP-1 e, soprattutto NGAL, potrebbero essere usati come marcatori addizionali per determinare la severità della malattia nei pazienti ADPKD e per seguire il decorso della malattia nella pratica clinica [27]. Questo dato sperimentale ottenuto per KIM-1 è rafforzato dallo studio del modello murino di ADPKD. Infatti, Kuehn e colleghi hanno dimostrato che l'espressione di KIM-1 nel tubulo renale è strettamente associata con la parziale dedifferenziazione delle cellule dell'epitelio renale e, quindi, potrebbe avere un ruolo chiave nello sviluppo della fibrosi interstiziale nel rene [28] (full text).

Alla luce degli studi presenti in letteratura, della complessità della diagnosi molecolare in ADPKD, della mancanza di una chiara correlazione genotipo-fenotipo e della necessità di individuare nuovi biomarcatori utili nella malattia policistica, in questo studio, si è valutato il livello plasmatico di NGAL in pazienti ADPKD con genotipo noto per indagare la presenza di un'eventuale correlazione con la sintomatologia clinica dell'ADPKD e con la perdita della funzionalità renale. In secondo luogo, si è indagato il ruolo e l'eventuale uso nella clinica nefrologica di NGAL come marcatore renale specifico nella malattia policistica renale, studiandone la correlazione con parametri routinariamente usati per la valutazione della funzionalità renale come Cr, Urea ed eGRF e con nuovi biomarcatori come la CysC.

In un recente lavoro, Bolignano e colleghi hanno studiato i livelli di NGAL nelle urine e nel siero di 26 soggetti policistici. In questo gruppo di soggetti, il livello di NGAL sia nel siero che nelle urine, è risultato molto elevato rispetto alla popolazione di controllo ed strettamente correlato con eGFR. Inoltre, questo lavoro riporta un'associazione tra il numero di cisti sviluppate e le dimensioni dei reni ed il livello di NGAL in urine e siero; sulla base di questo dato, gli autori conclusero che il livello di NGAL è correlato con la crescita delle cisti e ipotizzarono il coinvolgimento di questa proteina nel meccanismo di cistogenesi [19]. In maniera opposta al gruppo di Bolignano, Parikh e colleghi, hanno riportato valori urinari di NGAL e IL-18 stabili e mediamente elevati, ma non correlati al Volume Renale Totale e al eGFR in 107 pazienti policistici seguiti dal Consortium for Radiologic Imaging for the Study of Polycystic Kidney Disease (CRISP) per 4 anni. In aggiunta, questo stesso gruppo ha evidenziato valori molto elevati di NGAL e IL-18 nel fluido proveniente da cisti ADPKD [29]. Dal loro punto di vista, l'aumentata concentrazione di NGAL nel siero e nelle urine rilevata dal gruppo di Bolignano sarebbe da imputare maggiormente al grado di disfunzione renale che alla presenza delle cisti renali. Alla luce di queste osservazioni e dei nostri risultati, NGAL potrebbe essere un buon biomaratore negli stadi avanzati di ADPKD piuttosto che negli stadi iniziali della malattia.

Il rene policistico è caratterizzato da un'estrema variabilità nella progressione e severità della malattia e nelle manifestazioni renali ed extrarenali correlate. Numerosi studi documentano una significativa variabilità fenotipica sia a livello inter-familiare che a livello intra-familiare. L'ampia variabilità osservata per l'ADPKD può essere spiegata facendo riferimento a tre diversi livelli genetici: la variabilità genetica, la variabilità allelica e la presenza e, quindi, l'effetto, di geni modificatori. Come già sottolineato, la variabilità genetica è attribuibile all'eterogeneità di locus genetico: le mutazioni in *PKD1* sono associate ad un

fenotipo più grave, alla necessità di dialisi circa 20 anni prima (54 *versus* 74 anni), ad una manifestazione precoce dei sintomi [6] ed ad una maggiore incidenza di ipertensione ed ematuria [30]. Purtroppo, sono presenti molto meno informazioni per quanto riguarda l'impatto dell'eterogeneità allelica sul fenotipo. In generale, pazienti con mutazioni nella regione 5' di *PKD1* necessitano di una terapia renale sostitutiva precocemente (53 *versus* 56 anni) [7] (full text); sempre in questi pazienti c'è una prevalenza maggiore di aneurismi cerebrali [31].

Queste osservazioni, però, non spiegano l'ampia variabilità fenotipica, sia a livello di manifestazioni extrarenali che di progressione della malattia, che si osserva tra individui della stessa famiglia che quindi hanno ereditato la stessa mutazione germinale [1]. La variabilità intra-familiare potrebbe essere dovuta ad un debole coinvolgimento di fattori ambientali, o più verosimilmente ad una forte implicazione del *background* genetico e alla presenza di geni modificatori, cioè geni non direttamente associati con i loci *PKD1* o *PKD2*, ma il cui genotipo è correlato con il fenotipo ADPKD [8] (full text). Lo studio della variabilità fenotipica nella funzione renale in gemelli monozigoti e in fratelli supporta l'ipotesi del coinvolgimento di geni modificatori nell'ADPKD [32] [33]. Inoltre, studi in animali modello ADPKD hanno dimostrato che la natura e la severità della malattia renale associate ad una specifica mutazione sono strettamente dipendenti dal contesto genetico in cui si trova il difetto. Fain e colleghi hanno evidenziato che, nel caso di mutazioni in *PKD1*, la variabilità fenotipica è influenzata dal *background* genetico e da geni modificatori in una percentuale che varia dal 18% al 59% [34].

I valori plasmatici di NGAL misurati nei pazienti con ADPKD in stadio II-III, seguiti nel nostro ambulatorio non ci permettono di distinguere pazienti con mutazioni in *PKD1* da pazienti con mutazione in *PKD2*, almeno nella fascia di funzionalità renale analizzata. Ciò evidenzia che non esiste una differenza sostanziale tra i valori di NGAL in pazienti ADPKD in stadio II-III con mutazioni in *PKD1* o *PKD2*. L'unico strumento che ci permette questo tipo di distinzione rimane l'analisi genetica che si basa sull'analisi di *linkage* o sul sequenziamento diretto dei geni *PKD1* e *PKD2* con il metodo Sanger. Quest'ultimo metodo è molto costoso, laborioso ed impegnativo sia dal punto di vista delle tempistiche di esecuzione sia per quanto riguarda l'analisi e l'interpretazione dei risultati: infatti, si tratta di analizzare per ogni paziente circa 18.000 basi di DNA.

La caratterizzazione molecolare dei pazienti con ADPKD, anche se presenta ancora alcune difficoltà, sia tecniche che interpretative, sta assumendo un ruolo importante per gli studi clinici e in prospettiva per l'interpretazione dei risultati dei trial terapeutici. Infatti, la speranza è di sviluppare terapie che permetteranno di trasformare profondamente la situazione attuale dei pazienti e di arrivare ad una diagnosi precoce tale da permettere interventi terapeutici preventivi.

In conclusione, possiamo affermare che questo è il primo studio che valuta NGAL in funzione del genotipo ADPKD, affiancando un'analisi biochimica a quella genetica. I nostri risultati hanno evidenziato che i soggetti *wild type* provenienti dalle famiglie ADPKD arruolate nello studio, risultano essere dei controlli migliori rispetto a comuni controlli sani perché hanno valori di NGAL, Cr, Urea e CysC totalmente sovrapponibili a quelli dei controlli sani, ma condividono con i loro con sanguigni parte del patrimonio genetico. Usare questi soggetti *wild type* come controlli sani di riferimento, ci permetterebbe di ridurre l'ampia variabilità inter e intra-familiare e potrebbe, quindi, aiutarci ad indagare il ruolo di NGAL nella nefropatia policistica e a valutare il coinvolgimento di questa proteina nella malattia e nella citogenesi.

I valori di NGAL misurati nei pazienti con ADPKD, purtroppo, non ci permettono di distinguere pazienti con mutazioni in *PKD1* da pazienti con mutazione in *PKD2*. Ciò evidenzia che

non esiste una differenza sostanziale né tra i valori di NGAL in pazienti in stadio II-III con mutazioni in *PKD1* e *PKD2*.

Ulteriori studi che indagano la correlazione tra il difetto molecolare (genotipo) e la sintomatologia clinica dell'ADPKD (fenotipo) sono necessari e potrebbero essere utili per l'identificazione di biomarcatori appropriati per ADPKD utili per monitorare la progressione della malattia, soprattutto negli stadi iniziali della stessa.

Conflitto di Interessi: *I test per la misurazione di NGAL sono stati donate da Alere, Inc. Alere, Inc non ha partecipato né allo sviluppo del protocollo, né alla analisi, né all'interpretazione dei risultati. La dottoressa DN Cruz ha ricevuto l'incarico di speaker da Alere. Il Prof C Ronco è un consulente per Alere e uno speaker per Abbot Diagnostics. Gli altri autori non riportano la presenza di conflitti di interesse.*

Contributi economici agli autori: *Lo studio è stato supportato dalla Ricerca Sanitaria Finanziata dalla Regione Veneto (RSF N.261/06).*

Studi sperimentali su esseri umani: *Approvazione ottenuta dal Comitato Etico dell'Azienda Ulss 6 Vicenza - Ospedale San Bortolo (N. 47/07).*

Bibliografia

- [1] Torres VE, Harris PC, Pirson Y et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007 Apr 14;369(9569):1287-301
- [2] Gallagher AR, Germino GG, Somlo S et al. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease* 2010 Mar;17(2):118-30
- [3] Wilson PD Polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine* 2004 Jan 8;350(2):151-64
- [4] The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 1994 Jun 17;77(6):881-94
- [5] Mochizuki T, Wu G, Hayashi T et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science (New York, N.Y.)* 1996 May 31;272(5266):1339-42
- [6] Hateboer N, v Dijk MA, Bogdanova N et al. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* 1999 Jan 9;353(9147):103-7
- [7] Rossetti S, Burton S, Strmecki L et al. The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 2002 May;13(5):1230-7 (full text)
- [8] Tazón-Vega B, Vilardell M, Pérez-Oller L et al. Study of candidate genes affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *Nephrology, dialysis, transplantation* : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 2007 Jun;22(6):1567-77 (full text)
- [9] Devarajan P Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 2010 Jun;15(4):419-28
- [10] Virzi GM, Clementi A, de Cal M et al. Genomics and biological activity of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in several clinical settings. *Blood purification* 2013;35(1-3):139-43
- [11] Yang J, Mori K, Li JY et al. Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *American journal of physiology. Renal physiology* 2003 Jul;285(1):F9-18 (full text)
- [12] Mishra J, Mori K, Ma Q et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *American journal of nephrology* 2004 May-Jun;24(3):307-15
- [13] Mishra J, Ma Q, Prada A et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 2003 Oct;14(10):2534-43 (full text)
- [14] 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 Apr 2-8;365(9466):1231-8
- [15] Soni SS, Cruz D, Bobek I et al. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *International urology and nephrology* 2010 Mar;42(1):141-50
- [16] Malyszko J, Bachorzewska-Gajewska H, Sitniewska E et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in non-diabetic patients with stage 2-4 chronic kidney disease. *Renal failure* 2008;30(6):625-8
- [17] Devarajan P Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 2008;241:89-94
- [18] Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* : CJASN 2009 Feb;4(2):337-44 (full text)
- [19] Bolignano D, Coppolino G, Campo S et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with autosomal-dominant

polycystic kidney disease. American journal of nephrology 2007;27(4):373-8

[20] Corradi V, Gastaldon F, Virzi GM et al. [Epidemiological and molecular study of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in the province of Vicenza, Italy: possible founder effect?]. Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Società italiana di nefrologia 2010 Nov-Dec;27(6):655-63

[21] Corradi V, Gastaldon F, Virzi GM et al. Clinical pattern of adult polycystic kidney disease in a northeastern region of Italy. Clinical nephrology 2009 Oct;72(4):259-67

[22] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Annals of internal medicine 1999 Mar 16;130(6):461-70

[23] Cavalier E, Bekaert AC, Carlisi A et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) determined in urine with the Abbott Architect or in plasma with the Biosite Triage? The laboratory's point of view. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC 2011 Feb;49(2):339-41

[24] Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. Kidney & blood pressure research 2009;32(2):91-8

[25] Bolignano D, Basile G, Parisi P et al. Increased plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. Rejuvenation research 2009 Feb;12(1):7-14

[26] Zheng D, Wolfe M, Cowley BD Jr et al. Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in autosomal dominant

polycystic kidney disease. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2003 Oct;14(10):2588-95 (full text)

[27] Meijer E, Boertien WE, Nauta FL et al. Association of urinary biomarkers with disease severity in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a cross-sectional analysis. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation 2010 Nov;56(5):883-95

[28] Kuehn EW, Park KM, Somlo S et al. Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. American journal of physiology. Renal physiology 2002 Dec;283(6):F1326-36 (full text)

[29] Parikh CR, Dahl NK, Chapman AB et al. Evaluation of urine biomarkers of kidney injury in polycystic kidney disease. Kidney international 2012 Apr;81(8):784-90

[30] Tan YC, Blumenfeld J, Rennert H et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease: genetics, mutations and microRNAs. Biochimica et biophysica acta 2011 Oct;1812(10):1202-12

[31] Rossetti S, Chauveau D, Kubly V et al. Association of mutation position in polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype. Lancet 2003 Jun 28;361(9376):2196-201

[32] Peral B, Gamble V, San Millán JL et al. Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene induced by intronic deletion. Human molecular genetics 1995 Apr;4(4):569-74

[33] Persu A, Duyme M, Pirson Y et al. Comparison between siblings and twins supports a role for modifier genes in ADPKD. Kidney international 2004 Dec;66(6):2132-6

[34] Fain PR, McFann KK, Taylor MR et al. Modifier genes play a significant role in the phenotypic expression of PKD1. Kidney international 2005 Apr;67(4):1256-67