

Л.Я. Мигаль, Л.В. Король, Г.Г. Нікуліна, І.О. Дудар, Н.В. Желтовська

Ферменти сечі як маркери функціонального стану нирок при їх діабетичному ураженні

Изучали активность канальцевых ферментов лизосомальной (N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза – НАГ, ее термостабильный изофермент НАГ В и β-галактозидаза – β-Гал) и митохондриальной (L-канаваин: орнитин амидинотрансферазы – КОАТ) природы в моче 30 больных сахарным диабетом, осложненным диабетической нефропатией (ДН). Отмечено, что для больных ДН было характерно увеличение в моче активности НАГ, особенно ее термостабильного изофермента НАГ В и β-Гал, а также появление КОАТ, отсутствующей в моче здоровых лиц. Обнаружена четкая зависимость активности НАГ, НАГ В, β-Гал и КОАТ от функционального состояния паренхимы почек, что позволяет считать данные показатели маркерами прогрессирования диабетического процесса в почках у больных сахарным диабетом.

ВСТУП

Діабетична нефропатія (ДН), або діабетичний гломерулосклероз, – неіммунне дифузне прогресуюче ураження нирок, що неухильно розвивається на фоні цукрового діабету (ЦД). Головну роль у розвитку та прогресуванні ДН відіграє недостатньо коригована гіперглікемія, що запускає низку метаболічних порушень [4, 6]. Існують дані про те, що гіпертрофія та гіперфункція клубочків нирок можуть бути викликані підвищеним осмолярним навантаженням на тубулярні клітини при гіперглікемії за механізмом тубулогломерулярного зворотного зв'язку, а також про те, що гіперфільтрація є неспецифічним компенсаторним механізмом у відповідь на розвиток інтерстиціального фіброзу. Все це дозволяє вважати, що при ЦД внаслідок дії гіперглікемії розвиваються також тубулоінтерстиціальні ушкодження нирок [16, 19, 22]. Так, у хворих на ЦД під впливом патологічної дії гіперглікемії та в комбінації з багатьма іншими чинниками (метаболічними, імунологічними, інфекційними тощо) порушується, у першу чергу, функціональний

стан нирок, зокрема проявляються тубулоінтерстиціальні ушкодження паренхіми. Виходячи з вищезгаданого, актуальним є пошук нових підходів до діагностики прогресування ДН з позиції вивчення ролі тубулоінтерстиціальних порушень нирок за допомогою оцінки змін активності ферментів, що локалізовані в епітелії канальцевого відділу нефрону, ступінь виразності екскреції яких може свідчити про глибину ушкоджень проксимальних канальців нирок. Чутливим та неінвазивним методом діагностики тубулоінтерстиціальних порушень і втягнення нирок у патологічний процес є визначення змін активності умовно реноспецифічних ферментів сечі, зокрема ферментів лізосом, N-ацетил-β-D-глюкозамінідази (НАГ, КФ 3.2.1.30), її термостабильного ізоферменту НАГ В і β-галактозидази (β-Гал КФ 3.2.1.23) [1, 11, 16, 17], а також міцно пов'язаної з мембраною мітохондрій нефроцитів L-канаваин: орнітин амидинотрансферази (КОАТ, КФ 2.1.4.1)[7].

Метою нашого дослідження було виявлення можливості використання визначення активності НАГ, НАГ В, β-Гал і КОАТ у сечі як маркерів ураження паренхіми нирки при розвитку нефропатії у хворих на ЦД.

© Л.Я. Мигаль, Л.В. Король, Г.Г. Нікуліна, І.О. Дудар, Н.В. Желтовська

МЕТОДИКА

Обстежено хворих на ЦД, 13 чоловіків і 17 жінок віком від 40 до 62 років за умов субкомпенсації у них вуглеводного обміну. На підставі комплексного клініко-лабораторного обстеження та згідно з класифікацією Mogensen та співавт. [20] усі хворі були розподілені на дві групи залежно від стадії захворювання: група I – 16 осіб з IV стадією ДН без порушення функції нирок (вміст креатиніну крові 0,055–0,11 ммоль/л, швидкість клубочкової фільтрації – 65,5–114,3 мл/хв, добова протеїнурія 0,3–6,4 г/л), група II – 14 осіб з ДН і порушенням функції нирок (вміст креатиніну крові 0,155–0,272 ммоль/л, швидкість клубочкової фільтрації – 23–59 мл/хв, добова протеїнурія 0,3–15,3 г/л). У хворих II групи констатована хронічна ниркова недостатність (ХНН) різного ступеня виразності (8 хворих на ХНН I ступеня, 6 хворих на ХНН II–III ступеня). Контролем були 25 практично здорових осіб того ж віку та статі (без захворювань нирок і без ЦД у близьких родичів). Активність ферментів лізосомального походження – загальної НАГ і β -Гал визначали натщесерце у ранковій сечі за методом Покровського та співавт. [12]. Активність термостабільного ізоферменту НАГ В у сечі визначали так само, як і загальну активність НАГ, але після термоінактивації при 50°C і рН 5,0 протягом 3 год термолабільної ізофракції НАГ А сечі [18]. Метод визначення активності КОАТ оснований на реакції переносу амідинової групи з L-канаваніну на L-орнітин з утворенням L-аргініну, що визначають колоримет-

ричним методом за утворенням забарвленого комплексу з 8-оксихіноліном при наявності гіпоброміду натрію [9]. Статистичну обробку результатів виконували за допомогою програмного забезпечення Excell.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих результатів показав, що у всіх обстежених хворих на ДН спостерігається значне підвищення активності лізосомальних ферментів у сечі (таблиця). У хворих I групи цей показник був значно, з високим ступенем вірогідності, більшим порівняно зі значеннями у здорових осіб: активність загальної НАГ у середньому – у 22 рази, НАГ В – майже в 70 разів і β -Гал – у 7 разів відповідно. Це свідчить про суттєво виражене ураження паренхіми нирок, зокрема канальцевого відділу нефрону, головного місця локалізації ензимологічних показників лізосомального походження [1, 2, 13]. Нині вважається, що серед багатьох факторів, що супроводжують розвиток ДН і втягнення нирок у патологічний процес, лізосомальні ферментні системи першими реагують на будь-які патологічні зміни ниркових клітин при їх діабетичному ураженні [5, 10, 16]. Також доведено, що співвідношення ізоферментів НАГ (НАГ А/НАГ В) у сечі здорових людей має подібність до аналогічного співвідношення у нирковій тканині, а не у сироватці крові, що підкреслює їх реноспецифічність [21]. Тобто обидва ізоферменти НАГ проникають у сечу не за допомогою фільтрації через гломерули, а безпосеред-

Активність (мкмоль р-нітрофенолу · год⁻¹ · ммоль⁻¹ креатиніну) N-ацетил- β -D-глюкозамінідази (НАГ), її термостабільного ізоферменту НАГ В і β -галактозидази (β -Гал) у сечі хворих на діабетичну нефропатію (M ± m)

Група обстежених хворих	НАГ	НАГ В	β -Гал
Контрольна група (n=25)	11,64±0,72	1,56±0,096	9,58±0,68
I група (n=16)	166,55±15,53*	85,17±7,99*	54,92±6,12*
II група (n=14)	251,86±15,71*	111,68±9,05*	69,13±7,94*
	P _{I-II} <0,001	P _{I-II} <0,05	

* статистично достовірна різниця порівняно з показниками у контрольній групі.

ньо із тубулярного нефротелію (з місця своєї локалізації). Проте за умов патології співвідношення ізоферментів НАГ порушується у бік збільшення відсотка термостабільного ізоферменту НАГ В і зменшення термолabileного НАГ А [10].

Порівняльний аналіз між показниками у I і II групах показав (див. таблицю), що у хворих на ДН з порушенням функції нирок (II група) спостерігається статистично істотне збільшення загальної активності НАГ сечі та її термостабільного ізоферменту НАГ В. Слід відмітити виражену тенденцію до підвищення активності β -Гал сечі у хворих групи II. Це, можливо, зумовлено різною внутрішньолізосомальною локалізацією ензимів: НАГ – частково пов'язана з мембраною лізосом, а β -Гал є розчиненою в матриксі цієї внутрішньоклітинної органели [13].

Водночас відсоток активності термостабільного ізоферменту НАГ В від загальної активності НАГ у сечі хворих I та II групи суттєво зростає ($46,69 \pm 3,19$ та $45,24 \% \pm 4,06 \%$ відповідно) порівняно з контрольною групою ($14,04 \% \pm 0,58 \%$, $P < 0,001$). У хворих I і II групи цей показник був майже однаковим. Це зумовлено паралельним та односпрямованим підвищенням активності як загальної НАГ, так і активності НАГ В при прогресуванні патологічного процесу у нирках хворих на ДН. Проте за нашими та інших авторів даними [1, 10, 17] зміни активності термостабільного ізоферменту НАГ В порівняно із загальною НАГ мають більш виражені реноспецифічні властивості.

Виявлене нами суттєве збільшення активності НАГ, НАГ В і β -Гал сечі у хворих II групи порівняно зі значеннями у осіб I групи свідчить про те, що зміни активності лізосомальних ферментів сечі, безумовно, залежать від функціонального стану паренхіми нирки, зокрема тубулярного апарату нефрону. Отже, істотне підвищення активності лізосомальних ферментів у сечі хворих на ДН вказує не тільки на виражену

тубулопатію, а також до певної міри може бути причиною ушкоджень гломерулярного апарату внаслідок спроможності гідролаз лізосомального походження чинити руйнівну дію на базальну мембрану клубочків [3].

Встановлено значне підвищення активності КОАТ майже у всіх хворих. Активність КОАТ у хворих I групи становила за годину інкубації $0,031$ ммоль/л $\pm 0,006$ ммоль/л, а у хворих II групи – $0,053$ ммоль/л $\pm 0,008$ ммоль/л. Таким чином, активність КОАТ у сечі у хворих на ДН IV стадії на 42 % нижча, ніж у хворих з порушенням функції нирок. Тобто прогресування діабетичного ураження супроводжувалося підвищенням активності мітохондріальнопов'язаного ферменту в сечі, що вказує на більш серйозні пошкодження клітин проксимальних каналців. Встановлений факт, на наш погляд, свідчить про суттєво виражене тубулоінтерстиціальне ураження нирок, зокрема каналцевого відділу нефрону – основного місця локалізації КОАТ [7, 9]. Як відомо, ДН – це специфічне ураження нирок з переважним втягненням у патологічний процес судин клубочків. Проте практично не може бути лише ізольованого ураження капілярів клубочків без паралельного, а з часом і переважного ураження нефроцитів каналцевого відділу нефрону, що підтверджено даними морфологічних (електронно-мікроскопічних) досліджень біоптату нирок [4, 5], а також вищенаведеними результатами нашого дослідження.

Щодо можливих причин виникнення констатованої нами гіперензимурії загальної НАГ, НАГ В і КОАТ у хворих на ДН, то це безумовно є ішемічні процеси в паренхімі нирок, що розвиваються за будь-якого порушення кровопостачання. Більшою мірою це стосується хворих зі специфічною гломерулярною мікроангіопатією. У зв'язку з тим, що реакція каналцевого відділу нефрону на ішемію є найбільш ранньою та найчутливішою, вона супроводжується ініціацією підвищення проникності клітинних

і субклітинних мембран і виходом у позаклітинний простір (тобто сечу) значної кількості ензимних білків [1]. Виявленню у сечі хворих на ДН КОАТ, також сприяє своєрідна локалізація численних паличкоподібних мітохондрій між плазматичними клітинними мембранами саме у звивистих проксимальних каналцях [15]. Можливим механізмом для підвищеної екскреції у сечу лізосомних ензимів є протеїнурія, що призводить до перевантаження лізосомального апарату тубулярного відділу нефрону реабсорбованим білком [17]. Крім того, важливе значення для розуміння механізму гіперензимурії саме лізосомальних гідролаз має здатність цих ферментів, що локалізовані в нефроцитах звивистих проксимальних каналців, з'являтися у сечі навіть без порушень цілісності плазматичних мембран епітеліальних клітин за допомогою внутрішньоклітинної секреції та екзоцитозу [1]. Отримані нами результати суперечать думці деяких дослідників про те, що активність лізосомальних ферментів сечі у пацієнтів з ДН певною мірою залежить від рівнів гіперглікемії та глюкозурії у цієї категорії хворих [14]. Як свідчать отримані нами результати (див. таблицю), прогресування патологічного процесу діабетичного генезу у нирках хворих на ДН супроводжується значним підвищенням активності лізосомальних ензимів сечі, водночас паралельно з прогресуванням ДН у силу багатьох причин знижуються або навіть зникають гіперглікемія та глюкозурія [8].

Отже, комплексне визначення активності лізосомальних гідролаз і мітохондріальної КОАТ – ферментів з умовно реноспецифічними властивостями, вказує на наявність поширеної деструкції нефротелію каналцевого відділу нефрону при прогресуванні діабетичного ураження нирок у хворих на ЦД. У цілому, отримані результати свідчать про можливість використання цих ферментних показників як маркерів контролю за функціональним станом при

діабетичному ураженні паренхіми нирок, зокрема за станом лізосомальних і мітохондріальних мембран клітин тубулярного відділу нефрону при прогнозуванні прогресування ДН.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено, що у хворих на ДН спостерігається суттєве підвищення активності лізосомальних ферментів НАГ, особливо активності її термостабільного ізоферменту НАГ В, β -Гал, а також активності мітохондріального ферменту КОАТ (у здорових осіб відсутня) порівняно з контролем.

2. Прогресування діабетичного ураження нирок супроводжується статистично вірогідним збільшенням активності НАГ, НАГ В і КОАТ у сечі хворих з ДН при порушенні функції нирок порівняно з хворими без порушення функції, що відповідає функціональному стану нирок за вмістом креатиніну крові та швидкості клубочкової фільтрації, і дозволяє вважати ці ферменти маркерами прогресування діабетичного процесу у нирках у хворих на ЦД.

L.A. Migal, L.V. Korol, G.G. Nikulina, I.A. Dudar, N.Y. Zeltowskya

URINARY ENZYMES AS MARKERS OF FUNCTIONAL STATE OF KIDNEYS WITH DIABETIC LESIONS

Activity of tubular lysosomal (N-acetyl- β -D-glucosaminidase – NAG, its thermostable isoenzyme NAG B and β -galactosidase – β -GAL) and mitochondrial (L-canavanine: ornithine amidinotransferase – COAT) enzymes were measured in urine of 30 patients with diabetes complicated by diabetic nephropathy (DN). It was shown that activity of NAG, especially its thermostable isoenzyme NAG B and also β -GAL in urine of DN patients was higher compare to those in healthy subject. Moreover COAT activity was registered in urine of DN patients while it is not presented in healthy persons. The precise dependence of NAG, NAG B, β -GAL levels and COAT activity on the functional state of renal parenchyma in particular on tubular nephron nephrocytes was found that allows us to consider the given parameters as markers of diabetic process progressing in kidneys in patients with diabetes.

Institute of Nephrology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабаєва Н.И., Липицкая И.Я., Творогова М.Г., Титов В.Н. Диагностическое значение исследования активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче // Лаб. дело. – 1991. – №31. – С. 9–16.
2. Величко М.Б., Король Л.В., Нікуліна Г.Г., Мигаль Л.Я. Діагностичне значення реноспецифічної ферментурії при прогресуванні паренхіматозних захворювань нирок // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2004. – № 1. – С. 18–20.
3. Голов К.Г., Варшавский В.А., Окунев Д.Ю. и др. Ферментурія в оценке ранней стадии поражения почек при псориазе и сахарном диабете // Терап. архив. – 1995. – 67, №10. – С. 80–81.
4. Дедов И.И., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия. – М.: Универсум Паблишинг, 2000. – 240 с.
5. Делекторская Л.Н., Окунев Д.Ю., Шестакова М.В. Значение ферментурии в ранней диагностике диабетической нефропатии // Лаб. дело. – 1990. – №7. – С. 10–14.
6. Ефимов А., Скробонская Н., Зуева Н. Диабетическая нефропатия // Ліки України. – 2004. – № 12. – С. 34–38.
7. Карелин А.А. Трансамидиназа и ее роль в биогенезе природных гуанидинов. – В кн.: Успехи биологической химии. – М.: Наука, 1974. – Т. 15. – С. 121–155.
8. Лапчинська І.І. Діабетичний гломерулосклероз. – У кн.: Нефрологія / За ред. Л.А. Пирого. – К.: Здоров'я, 1995 – С. 188–196.
9. Мардашев С.Р., Карелин А.А. Определение трансамидиназы в сыворотке крови и моче при поражениях почек и поджелудочной железы. – В кн.: Методы исследования активности некоторых ферментов в клинике. – М.: Наука, 1967. – С. 67–76.
10. Мигаль Л.Я., Веселовська З.Ф., Кіндій Т.В. Діагностика ранньої (передклінічної) стадії ураження нирок за допомогою дослідження співвідношення ізоферментів N-ацетил-в-D-глюкозамінідази у сечі хворих з діабетичними змінами очного дна // Лаб. діагностика. – 2003. – № 2. – С. 8–11.
11. Нікуліна Г.Г., Король Л.В., Мигаль Л.Я. Ферментні маркери патології клітинних мембран при захворюваннях нирок // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2004. – № 1. – С. 30–33.
12. Покровский А.А., Кравченко Л.В., Тутьельян В.А. Исследование активности ферментов лизосом при действии афлатоксина и митомицина // Биохимия. – 1971. – 36, № 4. – С. 690–696.
13. Покровский А.А., Тутьельян В.А. Лизосомы. – М.: Наука, 1976. – 382 с.
14. Ракова Н.Г. Патогенез и лабораторная диагностика диабетической нефропатии (обзор литературы) // Клини. лаб. диагностика. – 1998. – №5. – С. 3–9.
15. Рябов С. И., Наточин Ю. В. Функциональная нефрология. – СПб.: Лань, 1997. – 304 с.
16. Семидоцкая Ж.Д., Красовская Е.А. К вопросу о канальцевых дисфункциях при диабетической нефропатии // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2004. – №2. – С. 15–17.
17. Фоменко Г.В., Липицкая И.Я., Арабидзе Г.Г., Титов В.Н. Диагностическое значение энзимурии (обзор литературы) // Клини. лаб. диагностика. – 1994. – № 4. – С. 37–41.
18. Цветкова И.В., Козина А.Б., Методы определения N-ацетил-в-D-гексозаминидазы А для пренатальной диагностики болезни Тея-Сакса и выявления гетерозиготных носителей заболевания // Совр. методы в биохимии. – М.: Медицина, 1974. – С. 132–176.
19. Bohle A. Change of paradigms in nephrology- a view back and forward // Nephrol. Dial. Transplant. – 1998. – 13. – P. 556–563.
20. Mogensen C. E., Christensen C., Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropaty // Diabetes. – 1983. – 32. – P. 64–78.
21. Multbery B., Isaksson A. Enzyme immunoassay of v-hexosaminidase isoenzymes in human urine and renal cortex with monoclonal antibodies // Enzyme. – 1989. – 42, №1. – P.25–30.
22. Ziyadeh F. Significance of tubulointerstitial changes in diabetic renal disease // Kidney Int. – 1996. – 49 (Suppl.54). – P. S10–S13.