

УДК 616.151.514

Е.Е. Климова, Д.В. Фёдоров

E-mail: KlimAG@yandex.ru

**ФЕРМЕНТНЫЕ МАРКЁРЫ
ПОВРЕЖДЕНИЯ КАНАЛЬЦЕВ
ПОЧЕК ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ
ВЫРАЖЕННОСТИ НАРУШЕНИЯХ
МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ У
БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ**

Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

Гемофилия – врождённый геморрагический диатез, характеризующийся рецидивирующими кровотечениями различной локализации. Одно из частых осложнений тяжёлого течения гемофилии – формирование гемофилической нефропатии. Ведущим симптомом поражения почек при гемофилии является рецидивирующая микро- или макрогематурия, которая встречается у 14-30% больных [1]. Гематурия может возникать спонтанно, после перенесённой респираторной инфекции в связи с незначительными травмами поясничной области. Появлению и усилению гематурии способствуют приём нестероидных противовоспалительных средств, массивные трансфузии крови и плазмы. При купировании данного синдрома существенный потенцирующий эффект антигемофилическим препаратам оказывают глюкокортикоиды [1]. Динамическое наблюдение за больными гемофилией свидетельствует, что частота гематурии не всегда соответствует тяжести заболевания. Азотвыделительная функция почек у большинства больных остаётся стабильно нормальной, хотя в некоторых случаях развивается хроническая почечная недостаточность (ХПН) [1,2,3]. С.С. Бесмельцев и соавт. при ультразвуковом исследовании мочевыделительной системы у больных гемофилией в 90% случаев отмечают признаки хронического пиелонефрита и нефролитиаза [3]. Однако характер поражения почечной ткани и механизмы формирования гемофилической нефропатии остаются неясными.

Диагностические трудности в исследовании почек у больных гемофилией связаны с невозможностью морфологического изучения ткани органа по результатам пункционной биопсии в связи с высокой вероятностью развития тяжёлых геморрагических осложнений.

В этом плане перспективны исследования активности в моче ренальных ферментов. Энзимурия является индикатором поражения почек, указывая на повреждение гломерулярного и тубулярного отделов нефрона задолго до выявления его с помощью традиционных методов диагностики. Патологические процессы, происходящие в различных отделах нефрона, приводят к увеличению проницаемости цитомембран, активации лизосомальных систем клеток, в более тяжёлых случаях к цитолизу, что в свою очередь ведёт к увеличению экскреции с мочой ферментов [5,9,22]. Изучение активности ферментов с различной регионарной и субклеточной локализацией в нефроне позволяет определить топику и степень его повреждения [4], оценить активность и динамику патологического процесса.

Целью настоящего исследования является изучение клинического значения энзимурии у больных гемофилией для уточнения локализации и степени повреждения различных отделов нефрона в сочетании с оценкой основных показателей минерального обмена, а также определение диагностической ценности энзимурии в выявлении ранних признаков поражения почек.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 52 больных с тяжелой формой гемофилии А (уровень VIII фактора 0 – 2 %) и 5 больных гемофилией В (уровень IX фактора 0 – 2 %) в возрасте от 17 до 50 лет. Исследование мочи проводилось вне эпизодов гематурии, у больных не было клинико-лабораторных признаков нефротического синдрома. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц мужского пола в том же возрасте. Нами проведено исследование ферментов мочи с различной клеточной и субклеточной локализацией в нефроне: гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ, КФ 2.3.2.2), щелочной фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.3.1), связанных с плазматической мембраной (щёточной каёмкой) тубулярного эпителия; лейцинаминопептидазы (ЛАП, КФ 3.4.11), находящейся в цитоплазме клеток эпителия проксимального отдела канальцев; лизосомального

фермента N-ацетил-b-D-глюкозаминидазы (НАГ, КФ 3.2.1.30), сосредоточенного в эпителии извитой части проксимального отдела нефрона. Определение активности в моче этой группы ферментов позволяет выявлять уровень и глубину поражения тубулярного отдела нефрона. У всех больных определяли концентрацию Са, Р, Mg и мочевой кислоты в моче. Наряду с этим неоднократно проводили общий анализ мочи и определяли скорость клубочковой фильтрации. Активность ферментов определяли в разовой утренней порции мочи: 10 мл центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин и проводили диализ 2 мл супернатанта (1мл мочи против 200 мл физиологического раствора).

Метаболизм костной ткани оценивался по содержанию кальция (Са) и фосфора (Р) в сыворотке крови и моче, о состоянии формирования костной ткани судили по активности костной фракции щелочной фосфатазы в сыворотке крови, об уровне резорбции – по содержанию оксипролина в крови и моче. Все биохимические исследования выполняли с помощью коммерческих тест систем фирмы «Boehringer Mannheim» (Германия) на автоматическом анализаторе «BM/Hitachi 911E». Активность ферментов и концентрацию кальция в моче пересчитывали на 1 ммоль креатинина, содержание которого определяли в утренней порции мочи.

В нашей работе мы использовали двухэнергетическую рентгеновскую денситометрию на аппарате фирмы PRODIGY. Исследование минеральной плотности костной ткани (МПКТ) проводили в поясничном отделе позвоночника и проксимальных отделах бедренных костей. Результаты исследований МПКТ оценивались согласно рекомендациям ВОЗ по T-критерию у больных старше 18 лет и по Z-критерию до 18 лет. T-критерий - это количество стандартных отклонений (SD) ниже среднего показателя, характерного для пика костной массы.

По данному показателю можно определить риск развития переломов. Величина T-критерия от -1.0 до -2.5 расценивается как остеопения (доклиническая стадия остеопороза), а показатель ниже -2.5 как остеопороз. Z-критерий – это стандартное отклонение от значений лиц того же возраста, то есть популяционной нормы.

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента и корреляционного анализа компьютерной программы Statistica for Windows 6.0. Показатели представлены как $M \pm SD$. Коэффициенты корреляции и различия средних считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования активности ферментов мочи представлены в табл. 1.

В группе больных гемофилией выявлено увеличение активности практически всех исследуемых ферментов: активность НАГ превышала контрольные показатели в 2,5 раза, ЩФ и ЛАП – в 2 раза, ГГТ – более чем в 1,5 раза. Это позволило нам предположить, что при гемофилической нефропатии в патологический процесс вовлечён тубулярный отдел нефрона, причём выявлена активность как мембран-ассоциированных, так и внутриклеточных ферментов. Данный патологический процесс сопровождается повреждением щеточной каёмки, повышением проницаемости цитомембран, активацией лизосомальных систем клеток.

Однако необходимо отметить отсутствие у исследуемой группы больных изменений функциональной способности почек. Концентрация креатинина в сыворотке крови не отличалась от нормы (76 ± 2 мкмоль/л; контроль – 75 ± 2 мкмоль/л; $p > 0,5$), скорость клубочковой фильтрации составляла 98 ± 1 мл/мин (контроль – 99 ± 1 мл/мин; $p > 0,5$), относительная плотность мочи колебалась в пределах 1018 – 1023. Сходные данные при оценке функции почек у больных гемофилией были получены и другими исследователями.

Учитывая наличие у большинства больных гемофилией сонографических признаков нефролитиаза, мы провели исследование минерального обмена – Са, Р и мочевой кислоты, которые нередко участвуют в формировании уролитиаза (табл. 2).

В результате исследования установлено наличие у больных гемофилией синдрома гиперкальциурии. Для проведения сравнительного анализа характера энзимурии и кальциурии исследуемые больные были разделены на две группы. В первую группу включены

Таблица 1

Активность энзимов мочи у больных гемофилией ($\bar{x} \pm m$)

Группа обследованных	Число обследованных	ЩФ	ГГТ	ЛАП	НАГ
Больные гемофилией	57	$4,1 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,8$	$0,40 \pm 0,06$
Контрольная	30	$2,1 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,3$	$0,15 \pm 0,03$
p		$< 0,02$	$< 0,02$	$< 0,01$	$< 0,01$

Таблица 2

Содержание (в ммоль/л) кальция, фосфора и мочевой кислоты в моче у больных гемофилией ($\bar{x} \pm m$)

Группа обследованных	Число обследованных	Са	Р	Мочевая кислота
Больные гемофилией	57	$4,5 \pm 0,5$	$20,2 \pm 3,1$	$3,2 \pm 0,3$
Контрольная	30	$1,7 \pm 0,3$	$20,5 \pm 2,1$	$3,5 \pm 0,3$
p		$< 0,001$	$> 0,5$	$> 0,5$

больные с гиперкальциурией, во вторую – с нормокальциурией. У больных первой группы содержание ферментов в моче, связанных со щёточной каёмкой (ГТТ и ЩФ), значительно превышало контрольные показатели, тогда как во второй группе не отличалось от нормы. Активность цитозольного и лизосомального ферментов (ЛАП и НАГ) в первой и второй группах не различалась, но превышала контрольные значения.

Учитывая значимую разницу в активности мембран-ассоциированных энзимов (ГТТ и ЩФ) между первой и второй группами, мы провели корреляционный анализ взаимосвязи концентрации Са и активности ГТТ и ЩФ в моче. Установлена статистически значимая прямая связь между выраженностью кальциурии и активностью в моче как ГТТ ($r = 0,61$; $p < 0,05$), так и ЩФ ($r = 0,69$; $p < 0,05$).

Исходя из данных разных авторов о повреждающем действии гиперкальциурии на тубулярный отдел нефрона и опираясь на результаты нашего исследования, можно считать, что у больных гемофилией поражение проксимального отдела канальцев (в частности повреждение щёточной каёмки нефротелия) связано с высокой экскрецией кальция с мочой. Это позволяет высказать предположение, что гиперкальциурия, по-видимому, является одним из факторов, лежащих в основе гемофилической нефропатии.

Учитывая гиперкальциурию и наличие артропатий у больных гемофилией, нами проведено исследование минеральной плотности костной ткани с помощью компьютерной денситометрии. Было выявлено статистически значимое снижение минеральной плотности костной ткани в области поясничного отдела позвоночника и в проксимальном отделе бедренной кости, что является общепризнанным критерием системного остеопороза ($T = -1,44 \pm 0,17$; $T_k = +0,45 \pm 0,31$; $P < 0,05$ и $Z = -1,38 \pm 0,14$; $Z_k = +1,47 \pm 0,33$; $P < 0,05$).

Учитывая разную степень снижения минеральной плотности костной ткани у исследуемых больных, последние были разделены на две группы. В первую группу включены 12 больных без снижения МПКТ и начальными проявлениями остеопении ($T_1 = -0,83 \pm 0,09$; $Z_1 = -0,87 \pm 0,08$), во вторую группу – 40 больных с выраженной остеопенией и остеопорозом ($T_2 = -2,31 \pm 0,17$; $Z_2 = -2,12 \pm 0,14$), ($P_{T1-2} < 0,05$; $P_{Z1-2} < 0,05$).

У этих двух групп больных проведено исследование основных маркёров метаболизма костной ткани (табл. 4, 5).

У больных без снижения МПКТ и начальными проявлениями остеопении определялось повышение активности костного изофермента щелочной фосфатазы, а также увеличение уровня оксипролина в сыворотке крови, что свидетельствует об ускоренном обмене костного коллагена на фоне умеренной активации остеолитических и остеобластических процессов, при сохранении нормальных показателей Са и Р в крови и моче.

У больных с выраженной остеопенией и остеопорозом наблюдалось умеренное повышение концентрации Са и Р в сыворотке крови и значительное увеличение экскреции кальция с мочой, а также высокая активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови, значительное увеличение концентрации оксипролина сыворотки крови и его повышенное выделение с мочой. Данные изменения свидетельствуют о выраженных остеолитических процессах, сопровождающихся резорбцией минеральной части костной ткани. При этом, учитывая данные денситометрии и биохимических исследований, можно предположить преобладание остеолитических процессов, несмотря на значительную активацию и остеопролиферативных процессов (высокая активность костной фракции щелочной фосфатазы).

Таким образом, у большей части больных тяжёлой формой гемофилии имеет место общее снижение минеральной плотности костной ткани, что сопровождается гиперкальциурией, которая в свою очередь является одним из факторов повреждения канальцев почек по данным изучения активности тубулярных ферментов мочи. Исследование характера энзимургии позволило нам уточнить топик и степень повреждения нефрона у больных гемофилией. Результаты общепринятых лабораторных методов исследования почек (общий анализ мочи, определение клубочковой фильтрации, концентрации креатинина в сыворотке крови) у больных гемофилией были в пределах нормы. Между тем исследование активности энзимов мочи показало наличие у большинства больных различных по степени и характеру повреждений тубулярных структур нефрона. Основываясь на этом, можно счи-

Таблица 3

Активность ферментов мочи больных гемофилией (ед/ммоль креатинина) с нормо- (i группа) и гиперкальциурией (ii группа)

Группы больных	№	Са мочи, моль/л	Коэффициент Са/креатинин мочи	ЩФ	ГТТ	ЛАП	НАГ
I группа	18	1,6±0,2	0,27±0,02	2,2±0,9	2,0±0,4	5,6±1,1	0,28±0,04
II группа	39	5,1±0,2	0,58±0,02	6,7±1,0	4,6±0,7	6,4±0,9	0,42±0,08
Контроль (к)	30	1,7±0,2	0,25±0,02	2,1±0,1	2,5±0,2	3,3±0,3	0,15±0,03
p I-II		<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	>0,5	<0,2
p II-к		<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01
p I-к		>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	<0,05	<0,01

Таблица 4

Основные показатели минерального обмена

Группы больных	№	Концентрация в сыворотке ммоль/л		Концентрация в моче ммоль/л	
		Ca	P	Ca	P
I группа	12	2,35±0,04	1,18±0,06	1,71±0,32	20,24±3,06
II группа	45	2,57±0,02	1,63±0,06	5,43±0,21	31,60±9,12
Контроль (к)	30	2,34±0,03	1,16±0,05	1,65±0,21	20,45±2,04
p		p I-k>0,5 p II-k<0,001 p I-II<0,001	p I-k>0,5 p II-k<0,001 p I-II<0,001	p I-k>0,5 p II-k<0,001 p I-II<0,01	p I-k>0,5 p II-k>0,5 p I-II>0,5

Таблица 5

Показатели метаболизма органического матрикса костной ткани у больных гемофилией

Группы больных	№	Сыворотка крови		Моча	
		№	Оксипролин мкмоль/л	Оксипролин мг/л	Оксипролин/креатинин
I группа	12	132,4±9,1	24,4±0,8	27,4±2,1	2,0±0,4
II группа	45	285,3±29,1	29,8±0,67	54,3±2,5	4,1±0,4
Контроль (к)	30	37,0±2,9	19,5±1,8	28,1±1,8	2,3±0,2
p		p I-k<0,001 p II-k<0,001 p I-II<0,001	p I-k<0,05 p II-k<0,001 p I-II<0,001	p I-k>0,5 p II-k<0,001 p I-II<0,001	p I-k>0,5 p II-k<0,001 p I-II<0,001

тать, что исследование активности ферментов мочи при гемофилической нефропатии перспективно для ранней диагностики и оценки динамики поражения различных отделов нефрона.

Представленный материал позволяет нам рекомендовать включить определение активности энзимов мочи в комплексный план исследования больных гемофилией. Метод неинвазивен, безвреден, высокоинформативен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы. – М., 1988.
2. Мышенцев Е.Н. // Гематол. и трансфузиол. – 1996. - № 5. – С. 39-43.
3. Бессмельцев С.С., Каргин В.Д., Назарова Н.С., Егорова Л.В. // Урол. и нефрол. – 1995. - № 3. – С. 22-24.
4. Мищенко Б.П., Длин В.В., Фокеева В.В. // Лаб. Дело. – 1989. - № 5. – С. 39-43.
5. Peng Huai-yan, Zhang Pu-shan, Gao Ying, Li Hong-wei// Zhongguo xiandai yixue zazhi = China J. Mod. Med. – 2005. - 15, № 8. - С. 1194-1197.
6. Zhao Chunxiang, Tian Lin, Li Jianguo, Lu Xiaoting// Weisheng yanjiu = J. Hyg. Res. – 2004. – 33, № 3. – С. 343-344.
7. Satarug Soisungwan, Nishijo Muneko, Ujjin Pailin, Vanavantitkun Yuvaree, Baker Jason R., Moore Michael R.// Toxicol. Lett. – 2004. – 148, № 3. - С. 187-197.
8. Arcidiacono Teresa, Soldati Laura, Terranegra Annalisa, Anglani Franca, Vezzoli Giuseppe// Clin. Cases Miner. and Bone Metab. – 2005. – 2, № 1. – С. 57-59.
9. Jin Taiyi, Wu Xunwei, Tang Yinqi, Nordberg Monica, Bernard Alfred, Ye Tingting, Kong Qinhu, Lundstrum Nils-Guran, Nordberg Gunnar F.// Biometals [КЭ]. – 2004. – 17, № 5. – С. 525-530.
10. Jin Taiyi, Hong Feng, Zhang Aihua// Biometals [КЭ]. – 2004. – 17, № 5. – С. 573-580.
11. Бабичева Н.Ю.// Региональная медицинская наука: тенденции и перспективы развития. «Аспирантские чтения – 2004»: Сборник материалов докладов 5-й Научной конференции молодых ученых, Самара, 14 окт., 2004. – 2004. – С. 398–400.
12. Исмагилов Р.З., Аязбеков Е.А., Ажитаева А.С. // Нефрол. и диализ – 2005. – Т.7 - № 3. 356 с.
13. Ермоленко В.М., Аметов А.С., Тотоева З.Н. // Нефрол. и диализ – 2005. – Т.7 - № 3. - С. 355-356.
14. Шараев П.Н., Габдрахманова Н.К., Стрелкова Т.Н., Сахабутдинова Е.П. // Клин. лабор. диагностика – 2004. - № 5. – С. 40-42.
15. Копылов Ю.Н., Белова М.А., Чернов А.Н., Кулагина Е.П. // Клин. лабор. диагностика – 2005. - № 10. – С. 71-72.
16. Хорунжая Л.В., Берёзов В.М., Громенков В.Д., Донскова Т.В. // Нефрол. и диализ – 2005. – т.7 - № 3. - 378 с
17. Королюк И.П., Бабичева Н.Ю.// Материалы VII Всероссий. научн. форума «Радиология 2006». – М., 2006. – С. 126-127.
18. Herget-Rosenthal Stefan, Poppen Dennis, Husing Johannes, Marggraf Gunter, Pietruck Frank, Jakob Heinz-Gunter, Philipp Thomas, Kribbten Andreas // Clin. Chem. – 2004.- 50, № 3.- С. 552-558.
19. Архипова Н.Н., Мальцев С.В., Шакирова Э.М.// Рос. педиатр. ж. – 2005, № 3. – С. 15-17.
20. Серова Л.Д., Чеботарева Е.В.// Клин. геронтол. – 2003. – 9, № 9. – 72 с.
21. Genetics of osteoporosis: Role of steroid hormone receptor gene polymorphisms/ Gennari L., Becherini L., Falchetti A., Masi L., Massart F., Brandi M.L.// J. Steroid Biochem. and Mol. Biol. – 2002. – 81, № 1. – С. 1-24.

22. Lysosomal enzymuria in the diagnosis and monitoring of diabetic nephropathy/ Gatsing Donatien, Adoga Godwin I.// Eurobiologiste.– 2004.– 35, № 271.– С. V/1–V/4.

ENZYMATIC MARKERS OF THE TUBULES OF THE KIDNEY IN DISTURBED METABOLISM OF BONE TISSUE IN HEMOPHILIA PATIENTS

Ye.Ye. Klimova, D.V. Fedorov

SUMMARY

Direct link between calcaruria stage and the activity of membrane-associated enzymes in the urine which points to injured action of the calcaruria on tubular part of nephron in patients having severe hemophilia is revealed. Standard laboratory methods of investigation do not reveal any changes but studying urine enzymes revealed injured tubular structures of nephron in most patients.
