

ZNAČAJ MOKRAĆNIH ENZIMA U DIJAGNOSTIKOVANJU OŠTEĆENJA TUBULA IZAZVANOG PROTEINURIJOM

Radmila Obrenović¹, Dejan Petrović², Nada Majkić-Singh¹, Mileta Poskurica², Biljana Stojimirović³

¹Institut za medicinsku biohemiju, KCS, Beograd

²Klinika za urologiju i nefrologiju, KBC »Kragujevac«, Kragujevac

³Institut za urologiju i nefrologiju, KCS, Beograd, Jugoslavija

Kratak sadržaj: Proteinurija dovodi do oštećenja ćelija proksimalnih tubula bubrega. U radu je ispitano 50 bolesnika (24 muškaraca i 26 žena), prosečne starosti 46,50 ± 13,08 godina, sa prosečnim klirensom endogenog kreatinina 87,29 ± 31,17 mL/min. Zavisno od stepena glomerulske proteinurije ispitanici su podeljeni u tri grupe. U prvoj grupi sa proteinurijom manjom od 0,3 g/24h bilo je 19 osoba (7 muškaraca i 12 žena), prosečne starosti 45,12 ± 13,28 godina, sa prosečnim klirensom endogenog kreatinina 94,27 ± 34,70 mL/min. Druga grupa sa proteinurijom od 0,3–3,0 g/24h imala je 18 bolesnika (8 muškaraca i 10 žena), prosečne starosti 45,39 ± 12,64 godina, sa prosečnim klirensom endogenog kreatinina 90,07 ± 31,89 mL/min. Treću grupu sa proteinurijom većom od 3,0 g/24h činilo je 13 bolesnika (9 muškaraca i 4 žene), prosečne starosti 50,08 ± 13,73 godina, sa prosečnim klirensom endogenog kreatinina 73,25 ± 20,44 mL/min. Za procenu oštećenja tubula ispitivani su enzimi alkalna fosfataza, gama-glutamyl-transferaza i N-acetil-β-D-glukozaminidaza u urinu. Utvrđeno je da je N-acetil-β-D-glukozaminidaza najosetljiviji pokazatelj oštećenja tubula izazvanog proteinurijom. Gama-glutamyl-transferaza je osetljiviji pokazatelj oštećenja tubula u odnosu na alkalnu fosfatazu.

Cljučne reči: proteinurija, oštećenje tubulointercijuma, mokraćni enzimi.

Uvod

Proteini plazme koji se filtriraju kroz bazalnu membranu glomerula reapsorbuju se u ćelijama proksimalnih tubula procesom endocitoze (1, 2). Kada je reapsorpcija proteina povećana i produžena menjaju se funkcionalne mogućnosti ćelija proksimalnih tubula (3–6). Proteine usisavaju vezikule, koje stvaraju hidrolitički aktivne sekundarne lizosome (1, 2). Uvećanje i prskanje lizozoma dovodi do oslobađanja enzima lizozoma, koji deluju citotoksično i prozapaljenski na ćelije proksimalnih tubula i intersticijum (3–7). Proizvodi razgradnje se oslobađaju kroz bazalnu membranu ćelija proksimalnih tubula u krvotok, a nesvarljivi ostaci se luče u lumen tubula procesom egzocitoze zajedno s lizosomalnim enzimima, uključujući N-acetil-β-D-glukozaminidazu (β-NAG). Zbog toga se u definitivnoj

mokraći u fiziološkim uslovima β-NAG nalazi u koncentraciji od 5 U/g kreatinina (1, 2).

Merenje *enzimurije* u nefrologiji je koristan, neinvasivan test za procenu anatomskog integriteta tubulointercijuma (8, 9). Iako je preko 50 enzima otkriveno u mokraći, samo nekoliko enzima je korišćeno za dijagnostikovanje bolesti bubrega. Najviše su korišćeni β-NAG, enzim lizozoma ćelija, i alkalna fosfataza (AP), alanin-aminopeptidaza (AAP) i gama-glutamyl-transferaza (γGT), enzimi četkaste površine ćelija proksimalnih tubula (10–13).

Cilj ovog rada je bio da se ispita veza između proteinurije i katalitičke aktivnosti ispitivanih enzima u mokraći, kao i da se utvrdi osetljivost bubrežnih enzima za dijagnostikovanje oštećenja tubulointercijuma izazvanog proteinurijom.

Bolesnici i metode

Ispitano je 50 bolesnika lečenih u Institutu za urologiju i nefrologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu od oktobra 1998. god. do oktobra 1999. god.,

Adresa autora

Mr Radmila Obrenović
Institut za medicinsku biohemiju
Višegradska 26, 11000 Beograd
Tel.: (011) 472 032

uz poštovanje Helsinške deklaracije o medicinskim istraživanjima i dobijenu saglasnost bolesnika.

Studija je uključila ispitanike sa klirensom endogenog kreatinina većim od 50 mL/min, bez kliničkih znakova hipovolemije, i bez upotrebe diuretika tokom sakupljanja mokraće. Pri svakom sakupljanju mokraće isključena je mokraćna infekcija mikrobiološkim pregledom uzorka mokraće.

U zavisnosti od stepena proteinurije bolesnici su podeljeni u tri grupe: I grupu s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h, II grupu s proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h i III grupu ispitanika s proteinurijom većom od 3,0 g/24h (Tabela I).

Biohemijske analize rađene su u Institutu za medicinsku biohemiju KCS u Beogradu. Uzorci krvi i mokraće uzimani su ujutru. Kreatinin u serumu i u uzorku 24h mokraće (sa deset puta većim razblaženjem) određivan je pomoću kolorimetrijskog testa, na aparatu *Monarch plus IL, Milan, Italy*. Vrednosti uree dobijene su potpunom enzimskom metodom (ureaza-glutammat-dehidrogenaza) uz korišćenje aparata kao za kreatinin. Proteinurija iz uzorka 24h mokraće određivana je kolorimetrijskim testom. Katalitička aktivnost β -NAG-a u uzorku 24h-mokraće određivana je kolorimetrijskim testom, a katalitička aktivnost alkalne fosfataze i γ GT u uzorku 24h-mokraće određivane su kolorimetrijskim kinetičkim testom.

Klirens supstance izračunat je pomoću formule: $C_x = \frac{U_x \cdot V_u}{P_x}$ mL/min, gde je C_x klirens ispitivane supstance (mL/min), U_x koncentracija ispitivane supstance u 24h mokraći (mmol/L), V_u zapremina mokraće za 24h (L), a P_x je koncentracija ispitivane supstance u plazmi (mmol/L).

Za statističku analizu dobijenih podataka korišćeni su: Student-ov T-test, Mann Whitney-ev U-test. Prag značajnosti bila je verovatnoća od 0,05 i 0,01.

Tabela I Opšti podaci o bolesnicima

Opšti podaci	Grupe					
	I		II		III	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Broj (N)	19		18		13	
Pol (m/ž)	7/12		8/10		9/4	
Starost (god)	45,12	13,28	45,39	12,64	50,08	13,73
Ccr (mL/min)	94,27	34,70	90,07	31,89	73,25	20,44
ZI	8		/		/	
Osnovna bubrežna bolest	NH	7	7	7	1	
	GN	4	11	11	12	

N broj ispitanika, m muškarci, ž žene, \bar{x} srednja vrednost, SD standardna devijacija, Ccr klirens endogenog kreatinina, ZI zdravi ispitanici, NH hipertenzivna nefropatija, GN glomerulonefritis.

Rezultati

Da bi se procenilo funkcionalno stanje bubrega ispitanicima su određene vrednosti uree i kreatinina u serumu, kao i klirens endogenog kreatinina. Svi ispitanici imali su koncentracije uree i kreatinina u serumu u granicama normalnih vrednosti. Bolesnici sa proteinurijom većom od 3,0 g/24h imali su veće koncentracije uree i kreatinina u serumu u odnosu na bolesnike sa proteinurijom manjom od 0,3 g/24h i bolesnike sa proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h, ali ta razlika nije statistički bila značajna ($p > 0,05$). Statistički značajne razlike između ispitivanih grupa bolesnika nije bilo ni u vrednostima klirensa endogenog kreatinina ($p > 0,05$), mada su bolesnici s proteinurijom većom od 3,0 g/24h imali lako snižen klirens endogenog kreatinina, a bolesnici u druge dve grupe normalan klirens endogenog kreatinina (Tabela II).

Za procenu očuvanosti anatomskog integriteta tubulskih ćelija ispitivana je katalitička aktivnost enzima četkastog pokrova: alkalne fosfataze, γ -glutamilttransferaze, kao i β -NAG-a, lizozomalnih enzima proksimalnih tubula u mokraći.

Bolesnici s proteinurijom većom od 3,0 g/24h imali su visoko statistički značajno veću katalitičku aktivnost alkalne fosfataze u mokraći u odnosu na bolesnike s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h ($P_{I,III} < 0,01$). Statistički značajne razlike u katalitičkoj aktivnosti alkalne fosfataze u mokraći nije bilo između bolesnika s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h i proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h ($P_{I,II} > 0,05$). Statistički značajna razlika u katalitičkoj aktivnosti alkalne fosfataze u mokraći nije nađena ni između bolesnika s proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h i proteinurijom većom od 3,0 g/24h ($P_{II,III} > 0,05$) (Tabela II).

Bolesnici s proteinurijom većom od 3,0 g/24h imali su visoko statistički značajnu razliku u katalitičkoj aktivnosti γ -glutamilttransferaze u mokraći u odnosu na bolesnike s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h ($P_{I,III} < 0,01$). Statistički značajna razlika u katalitičkoj aktivnosti γ -glutamilttransferaze u mokraći postojala je između bolesnika s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h i proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h ($P_{I,II} < 0,05$). Između bolesnika s proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h i proteinurijom većom od 3,0 g/24h nije nađena statistički značajna razlika ($P_{II,III} > 0,05$) (Tabela II).

Grupa bolesnika s proteinurijom većom od 3,0 g/24h imala je visoko statistički značajno veću katalitičku aktivnost β -NAG-a u mokraći u odnosu na grupu bolesnika s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h ($P_{I,III} < 0,01$), odnosno statistički visoko značajno veću katalitičku aktivnost β -NAG-a u odnosu na grupu bolesnika s proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h ($P_{II,III} < 0,01$). Između grupe bolesnika s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h i grupe bolesnika s proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h takođe je nađena visoko statistički značajna razlika u katalitičkoj aktivnosti β -NAG-a u mokraći ($P_{I,II} < 0,01$) (Tabela II).

Tabela II Prikaz ispitivanih parametara u zavisnosti od stepena proteinurije

Ispitivani parametri	Proteinurija (g/24h)								
	< 0,3 (I)		0,3 3,0 (II)			> 3,0 (III)			
	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	N
Urea (mmol/L)	6,01	1,81	19	6,33	3,16	18	6,69	2,44	13
Kreatinin (μ mol/L)	90,47	23,02	19	94,56	28,92	18	98,69	28,14	13
Ccr (mL/min)	94,27	34,70	19	90,07	31,89	18	73,25	20,44	13
AP (U/mmol)	1,69	0,71	19	2,72	2,63	18	3,02	1,06**	13
γ -GT (U/mmol)	2,81	1,40 \diamond	19	3,97	1,72	18	5,40	3,11**	13
β -NAG (U/mmol)	0,24	0,16*	19	0,66	0,58***	18	1,63	0,82**	13
Značajnost	\diamond P I, II <0,05			$\diamond\diamond$ P I, III <0,05			$\diamond\diamond\diamond$ P II, III <0,05		
	* P I, II <0,01			** P I, III <0,01			*** P II, III <0,01		
N broj bolesnika, \bar{x} srednja vrednost, SD standardna devijacija, Ccr klirens endogenog kreatinina, AP alkalna fosfataza, γ -GT gama-glutamil-transferaza, β -NAG N-acetil- β -D-glukozaminidaza									

Diskusija

Dosadašnja ispitivanja su potvrdila pretpostavku da bolesti koje primarno zahvataju glomerule pokreću sekundarni proces koji zahvata tubulointercijum i dovodi do atrofije tubula, infiltracije intersticijuma mononuklearnim ćelijama i ožiljavanja intersticijuma (14-16). Oštećenje ćelija tubula izazvano proteinurijom je najznačajniji patogenetski mehanizam koji povezuje oštećenje glomerula s infiltracijom intersticijuma mononuklearnim ćelijama i ožiljavanjem tubulointercijuma (4, 15, 16).

U dijagnostici oštećenja tubulointercijuma najviše su korišćeni enzim lizozoma β -NAG, i enzimi četkaste površine ćelija proksimalnih tubula alanin-amino-peptidaza (AAP), alkalna fosfataza (AP) i γ -glutamil-transferaza (γ GT) (12). N-acetil-beta-D-glukozaminidaza, enzim lizozoma ćelija proksimalnih tubula, koristi se kao pokazatelj tubulo-intersticijumskog oštećenja (1, 2, 8, 9, 12).

Pošto bolesnici s proteinurijom većom od 3,0 g/24h imaju visoko statistički značajno veću katalitičku aktivnost β -NAG-a u mokraći u odnosu na obe grupe bolesnika sa manjom proteinurijom, a katalitička aktivnost β -NAG-a u mokraći je visoko statistički značajno veća i kod bolesnika s proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h u odnosu na one s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h, može se zaključiti da je β -NAG najosetljiviji pokazatelj oštećenja tubulointercijuma izazvanog proteinurijom. Ovakvi rezultati su u skladu sa dosadašnjim ispitivanjima, koja su pokazala statistički značajnu povezanost između proteinurije i β -NAG-a.

Dokazana je jaka povezanost između stepena proteinurije i jačine izlučivanja β -NAG-a mokraćom kod bolesnika s različitim bolestima glomerula (11). Povećano izlučivanje β -NAG-a takođe je dokazano kod bolesnika s nefrotskim sindromom (11). Zna se da povećan promet proteina kroz ćelije proksimalnih tubula, kao posledica proteinurije, dovodi do povećane aktiv-

nosti enzima lizozoma. Pretpostavlja se da masivna proteinurija dovodi do curenja enzima lizozoma u citoplazmu ćelija tubula. Posledično oštećenje ćelija tubula može stimulisati zapaljenje i ožiljavanje intersticijuma bubrega (4, 15, 16).

Alkalna fosfataza i γ -glutamil-transferaza takođe su osetljivi indikatori bubrežnog oštećenja (8, 9, 12). Bolesnici s proteinurijom većom od 3,0 g/24h imaju visoko statistički značajno veću katalitičku aktivnost alkalne fosfataze i γ -glutamil-transferaze u mokraći u odnosu na bolesnike s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h. Statistički značajna razlika u katalitičkoj aktivnosti γ -glutamil-transferaze u mokraći postoji i između bolesnika s proteinurijom manjom od 0,3 g/24h i proteinurijom od 0,3 3,0 g/24h. To ukazuje da je γ -glutamil-transferaza u mokraći osetljiviji pokazatelj od alkalne fosfataze. Ovakvi rezultati u skladu su sa dosadašnjim ispitivanjima, koja su pokazala povišenu katalitičku aktivnost γ -glutamil-transferaze u mokraći, čak i u ranom stadijumu bolesti glomerula kod bolesnika s proteinurijom (8, 9, 12).

Dalje ispitivanje povezanosti aktivnosti bolesti sa histološkom nalazom, pogoršanjem bubrežne funkcije i promenama mokraćnog izlučivanja enzima (na primer: AP, γ GT i β -NAG-a) i niskomolekularnih proteina (na primer: α_1 -mikroglobulina) treba da omogući utvrđivanje najosetljivijih parametara za procenu oštećenja tubulointercijuma, koji bi u rutinskom kliničkom radu omogućili rano utvrđivanje stepena oštećenja tubulointercijuma.

Zahvalnost: Rad je urađen u okviru Projekta 1260 koji finansira Ministarstvo za nauku tehnologije i razvoj Republike Srbije.

THE IMPORTANCE OF URINARY ENZYMES IN DIAGNOSTIC OF TUBULAR DAMAGE CAUSED BY PROTEINURIA

Radmila Obrenović¹, Dejan Petrović², Nada Majkić-Singh¹, Mileta Poskurica², Biljana Stojimirović³

¹Institute of Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia, Belgrade

²Clinic of Urology and Nephrology, Clinical Center »Kragujevac«, Kragujevac

³Institute of Urology and Nephrology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Yugoslavia

Summary: Proteinuria causes damage to proximal tubular cells. To investigate the influence of different levels of glomerular proteinuria, we examined 50 patients (24 male and 26 female). Their creatinine clearance (Ccr) was higher than 50 mL/min (87,29 31,17 mL/min). According to the proteinuria range level, patients were separated in three groups. The first group, with proteinuria less than 0,3 g/24h, included 19 persons (7 man and 12 woman), mean age 45,12 13,28 years and mean Ccr 94,27 34,70 mL/min. Proteinuria 0,3 3,0 g/24h is the second group characteristic. This group included 18 patients (8 male and 10 female), mean age 45,39 12,64 years, with mean 90,07 31,89 mL/min. Patients with proteinuria higher than 3,0 g/24h were members of third group. Mean age 50,08 13,73 years and mean Ccr 73,25 20,44 mL/min are characteristics of 13 members (9 male and 4 female) of the third group. Enzymes alkaline phosphatase (AP), γ -glutamyl transpherase (γ GT) and N-acetyl- β -D-glucosaminidase (β -NAG) were used as parameters of tubular damage. Gama-glutamyl transpherase is more sensitive parameter of tubular damage then alkaline phosphatase. N-acetyl- β -D-glucosaminidase is the most sensitive parameter of tubular damage due to proteinuria.

Key words: proteinuria, tubular damage, urinary enzymes.

Literatura

- Guder WG, Hofmann W. Markers for the diagnosis and monitoring of renal tubular lesions. *Clin Nephrol* 1992; 38 Suppl 1: 3 7.
- Guder GW, Hofmann W. New strategies in screening urine for exclusion and differentiation of renal diseases by analyzing individual proteins. *Jugoslav Med Biohem* 1997; 16: 69 75.
- Abbate M, Benigni A, Bertani T, et al. Nephrotoxicity of increased glomerular protein traffic. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 304 12.
- Burton JC, Harris KP. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Int* 1996; 27: 765 75.
- Burton JC, Walls J. Interstitial inflammation and scarring: messages from the proximal tubular cell. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1505 7.
- Remuzzi G. Abnormal protein traffic through the glomerular barrier induces proximal tubular cell dysfunction and causes renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4: 339 42.
- Schreiner FG. Renal toxicity of albumin and other lipoproteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4: 369 73.
- Jung K. Urinary enzymes and low molecular weight proteins as markers of tubular dysfunction. *Kidney Int* 1994; 46 Suppl 47: 29 33.
- Jung K, Pergande M, Graubaum HJ, et al. Urinary proteins and enzymes as early indicators of renal dysfunction in chronic exposure to cadmium (see comments). *Clin Chem* 1993; 39: 757 65.
- Bosomworth PM, Aparicio RS, Hay WMA. Urine N-acetyl- β -D-glucosaminidase-A marker of tubular damage? *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 620 6.
- Costigan MG, Rustom R, Bone JM, et al. Origin and significance of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in renal patients with proteinuria. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 133 44.
- Idasiak-Piechocka I, Krzymanski M. The role tubulointerstitial changes in progression of kidney function failure in patients with chronic glomerulonephritis. *Przegl Lek* 1996; 53: 443 53.
- Price RG. The role of NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 1992; 38 Suppl 1: 14 9.
- Nath KA. The tubulointerstitium in progressive renal disease. *Kidney Int* 1998; 54: 992 4.
- D' Amico G. The clinical role of proteinuria. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 48 52.
- D' Amico G, Ferrario F, Rastaldi MP. Tubulointerstitial Damage in Glomerular Diseases: Its Role in the Progression of Renal Damage. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 124 32.

Rad primljen: 15. 02. 2002.

Prihvaćen za štampu: 15. 05. 2002.