

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.379-008.64-06:616.631-07

Л.В. ПЛАТОНОВА, С.Э. РАБИНОВИЧ, Н.И. ШОНО, Т.Г. ДЮЖЕВА,
Э.И. ГАЛЬПЕРИН

К ВОПРОСУ О ФЕРМЕНТУРИИ ПРИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Ферментные системы нефрона участвуют в поддержании как экскреторной функции почек, так и метаболического состояния их клеток [11]. Источником наибольшего количества ферментов в почках является проксимальный отдел канальцев нефрона [5]. Локализация ферментов в органеллах эпителиальных клеток почечных канальцев неравномерная. Мембраны щеточной каймы эпителия содержат щелочную фосфатазу, аланинаминопептидазу, γ -глутамилтрансферазу, 5'-нуклеотидазу и другие ферменты [4, 5, 12, 16]. В цитоплазме найдены аминопептидаза, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, нейтральная α -глюкозидаза и др. [4, 5, 8], в лизосомах — N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза, β -галактозидаза, β -глюкуронидаза, арилсульфатаза и др., в митохондриях — аспартатаминотрансфераза, глутаматдегидрогеназа, α -глюкозидаза и др. [1, 2, 4, 5, 21]. Функции разных ферментных систем почек многообразны. Так, лизосомы канальцевого эпителия и их ферменты ответственны за реабсорб-

цию макромолекул, прошедших гломерулярный фильтр [2]. Многочисленные пептидазы и дисахаридазы на поверхности клеток проксимального канальца расщепляют реабсорбированные олигопептиды и дисахариды до свободных аминокислот и моносахаридов [12], которые возвращаются в циркуляцию.

Многие ферменты почек чувствительны к ишемии, сопровождающей инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД) [3]. Отмечено, что наиболее раннюю реакцию на ишемию дает канальцевый отдел нефрона [20]. Поэтому начальные нарушения функции нефрона при сахарном диабете могут быть выявлены при исследовании в моче ферментов канальцевого отдела нефрона. В зависимости от глубины клеточного повреждения в моче выделяются ферменты разной субклеточной локализации. В условиях ишемии в первую очередь активируются ферменты лизосом [13]. В соответствии с функцией лизосом выделение их ферментов во внеклеточное пространство может происходить без нарушения целостности клеток путем секреции и дегрануляции [10]. При незначительном повреждении клеток почечной ткани в моче возрастает активность ферментов плазматических мембран. Появление в моче цитозольных ферментов обусловлено цитоллизом, повышение активности митохондриальных ферментов связано с некрозом клеток почечной ткани [5].

Гиперферментурия при ИЗСД показана многими исследователями; установлено повышение в моче активностей микросомальной аминопептидазы, β -глюкуронидазы, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы, γ -глутамилтрансферазы, Na^+ , K^+ -АТФазы [2, 4, 15, 19, 21]. Наиболее изученным из этих ферментов является N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза, имеющая лизосомальную локализацию [1, 2, 4, 5]. Выявлено повышение активности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы в моче у больных диабетом в стадии компенсации по сравнению со здоровыми лицами и в период кетоацидоза у больных ИЗСД [21]. Установлена корреляция между суточной экскрецией белка и активностью N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы в моче больных ИЗСД [14, 17, 19]. Из ферментов щеточной каймы повышенная активность γ -глутамилтрансферазы выявлена при кетоацидозе [17], щелочной фосфатазы и аланинаминопептидазы — при сахарном диабете с протеинурией [17]. Повышенная активность цитозольного фермента лактатдегидрогеназы отмечена в моче больных ИЗСД с протеинурией и без нее [4, 17]. Однако в литературе нет данных по комплексному изучению ферментов различной локализации в клетках эпителия канальцев у больных ИЗСД в период отсутствия как клинических (протеинурия), так и доклинических (гиперфльтрация, микроальбуминурия) признаков диабетической нефропатии.

Таким образом, целью настоящей работы явилась попытка оценки степени повреждения клеток эпителия почечных канальцев у больных ИЗСД по определению в моче этих больных активностей четырех ферментов, имеющих разную субклеточную локализацию — лизосомальных: N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (НАГ, КФ 3.2.1.730) и β -галактозидазы (ГА, КФ 3.2.1.23), а также аланинаминопептидазы (ААП, КФ 3.4.11.2) из мембран щеточной каймы и нейтральной α -глюкозидазы (ГЛ, КФ 3.2.1.20) из цитозоля.

Методика. В работе использовали следующие материалы: 4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид, 4-нитрофенил- β -D-галактопи-

ранозид и 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид фирмы "Sigma" (США), 4-нитроанилид-L-аланин фирмы "Serva" (ФРГ), краситель понсо S-кислотный красный фирмы "Reanal" (Венгрия), 96-ячеечные планшеты фирмы "Dunateck" (Швейцария).

Обследовано 127 больных ИЗСД в возрасте от 14 до 48 лет с длительностью заболевания от 2 до 25 лет. Все больные получали инсулин в дозах от 20 до 60 ЕД/сут в виде двукратных инъекций. Контрольную группу составили 27 здоровых лиц.

Объектом исследования являлась утренняя моча больных ИЗСД и здоровых лиц. Собранную мочу центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин и затем диализовали 10 — 15 ч против физиологического раствора для освобождения от низкомолекулярных ингибиторов ферментов [1]. В полученном диализате определяли активность ферментов [1]. Белок определяли в цельной моче.

Белок определяли методом с использованием красителя понсо S [18] с некоторыми модификациями [9]: к 0,05—0,5 мл мочи приливали 2 мл 0,008% раствора красителя понсо S в 3% растворе трихлоруксусной кислоты, центрифугировали 10 мин при 3500 об/мин. Супернатант сливали, осадок растворяли в 2 мл 0,2 н. NaOH. Оптическую плотность измеряли при 560 нм на спектрофотометре СФ-46. Концентрацию белка определяли по калибровочному графику, для построения которого использовали коммерческий препарат сывороточного альбумина человека (концентрации от 0,002 до 0,1 мг в пробе).

Активности НАГ, ГА и ААП определяли микрометодом, для чего использовали 96-ячеечные планшеты, предназначенные для иммуоферментных исследований. Оптическую плотность растворов в ячейках планшета измеряли на микрофотометре "Сапфир 002" (Россия). Все пробы (опытные и контрольные) были дублированы. Активность исследуемых ферментов выражали в наномолях соответствующего гидролизованного субстрата в 1 с на 1 л мочи.

Активность НАГ определяли по гидролизу 4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида [7] с модификациями, соответствующими микроисполнению: в ячейку планшета вносили 0,05 мл диализата мочи, 0,05 мл 7,5 мМ раствора субстрата в 0,5 М цитратно-фосфатном буфере pH 4,5. Пробу инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 0,2 М Na₂CO₃. В качестве контроля использовали две пробы: первая состояла из 0,05 мл диализата и 0,05 мл 0,5 М цитратно-фосфатного буфера pH 4,5, вторая — из 0,05 мл субстрата и 0,05 мл буфера pH 4,5; контрольные пробы инкубировали 30 мин при 37°C и добавляли в них по 0,2 мл 0,2 М Na₂CO₃. Оптическую плотность растворов в ячейках планшета измеряли при 405 нм.

Активность ГА определяли по гидролизу 4-нитрофенил- β -D-галактопиранозида [21] модифицированным нами методом: в ячейку планшета вносили 0,1 мл диализата мочи и 0,1 мл 5 мМ раствора субстрата в 0,1 М цитратном буфере pH 4,0. Контрольные пробы содержали: 1-я — 0,1 мл диализата мочи и 0,1 мл цитратного буфера pH 4,0; 2-я — 0,1 мл субстрата и 0,1 мл того же буфера. Все пробу инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 0,2 М Na₂CO₃. Оптическую плотность измеряли при 405 нм.

Активность ААП определяли по гидролизу 4-нитроанилин-L-аланина

[15] с модификациями: в ячейку планшета вносили 0,1 мл диализата мочи и 0,1 мл 2 мМ раствора субстрата в 0,1 М трис-НСl-буфере рН 7,8. Контролем служили две пробы: 1-я — 0,1 мл диализата и 0,1 мл трис-НСl-буфера рН 7,8; 2-я — 0,1 мл субстрата и 0,1 мл буфера рН 7,8. Пробы (опытную и контрольные) инкубировали 5 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 30% CH_3COOH . Оптическую плотность измеряли при 405 нм.

Активность ГЛ определяли по гидролизу 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозида [7]: к 0,02 мл диализата мочи добавляли 0,2 мл 1 мМ раствора субстрата в 0,2 М калий-фосфатном буфере рН 6,5. Контролем служили 0,02 мл диализата мочи в 0,2 мл буфера рН 6,5 и 0,02 мл буфера и 0,2 мл субстрата. Пробы инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 5 мл 0,2 М Na_2CO_3 . Флюоресценцию растворов определяли на флюориметре "Optica" (Италия) при длинах волн возбуждения 365 нм и испускания 436 нм.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с применением *t*-критерия Стьюдента и коэффициента корреляции (*r*) [6].

Результаты и обсуждение. В моче больных ИЗСД без доклинических и клинических признаков нефропатии и при их наличии и в моче здоровых лиц, взятых в качестве контроля, определена активность НАГ, ГА, ААП и ГЛ. У 51 больного содержание белка в моче соответствовало нормальным показателям, однако величины активностей НАГ у этих больных различались и колебались от нормальных показателей до 10-кратно превышающих таковые. Поэтому этих больных мы разделили на две группы: 1-ю группу (*n*=31) составили больные с нормальными величинами активностей НАГ и 2-ю группу (*n*=20) — больные с величинами активностей НАГ, превышающими норму. В 3-ю группу (*n*=42) вошли больные с микропротеинурией от 0,05 до 0,5 мг белка в 1 мл мочи (что соответствует микроальбуминурии от 0,03 до 0,3 мг альбумина в 1 мл мочи [4]) и в 4-ю группу (*n*=34) — больные с протеинурией, превышающей 0,5 мг белка в 1 мл мочи. Содержание белка в моче мы определяли методом с использованием красителя понсо S [18], поскольку этот метод не уступает по своей чувствительности основанному на иммунодиффузии методу [9] определения в моче альбумина — маркера раннего нарушения клубочковой фильтрации. В условиях нормопротеинурии (больные 1-й и 2-й групп) можно говорить о сопоставимости величин содержания общего белка и альбумина в моче [9].

У больных 1-й группы активность всех исследуемых ферментов в моче достоверно не отличалась от нормальных величин (табл. 1). Несмотря на отсутствие доклинических (микроальбуминурии) и клинических (протеинурии) признаков (табл. 2) диабетической нефропатии у больных 1-й и 2-й групп, у последних, помимо достоверного ($p < 0,001$) повышения активности НАГ в 3,5—4 раза, выявлено увеличение активности ГА в 2,4—2,8 раза ($p < 0,001$) по сравнению с нормой и таковой у больных 1-й группы. Активности ААП и ГЛ достоверно не различались у больных 1-й и 2-й групп и у здоровых лиц. У больных 3-й группы активность НАГ в 1,5 раза превышала таковую у больных 2-й группы ($p < 0,05$) и в 5,3—6,3 раза — у больных 1-й группы и у здоровых лиц ($p < 0,001$). Активность ГА возросла в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с таковой во 2-й группе и в 3,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению с активностью в 1-й группе и у здоровых лиц.

Таблица 1

Активности ферментов проксимального отдела канальцев нефрона в моче больных ИЗСД и здоровых лиц

Группа обследованных	n	Белок (мг/мл)	Активности ферментов, нмоль/с/л			
			НАГ	ГА	ААП	ГЛ
1-я	31	0,026±0,003	11,3±0,8	12,9±0,7	86,8±18,4	7,9±1,1
2-я	20	0,029±0,006	46,7±7,1	36,6±4,2	115,2±21,7	11,4±1,4
3-я	42	0,129±0,013	71,7±8,3	51,9±5,4	258,9±40,1	11,0±1,2
4-я	34	1,49±0,19	76,9±9,6	46,3±2,9	232,1±28,4	16,6±2,1
5-я (здоровые лица)	27	0,018±0,003	13,6±1,2	15,3±1,0	105,2±13,4	8,5±0,8
$P_{1,2}$		>0,05	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05
$P_{2,3}$		<0,001	<0,05	<0,05	<0,01	>0,05
$P_{3,4}$		<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
$P_{1,5}$		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05

Таблица 2

Доклинические и клинические признаки диабетической нефропатии у больных ИЗСД

Группа обследованных	Клубочковая фильтрация, мл/мин	Альбуминурия	Протеинурия
		г/л	
1-я	104,2±5,8	< 30	26±3
2-я	107,1±6,8	< 30	29±6
3-я	145,2±16,1	30 – 300	129±13
4-я	66,8±6,6	> 300	1490±190
5-я (здоровые лица)	80±12,0	< 30	18±3
$P_{1,2}$	> 0,05		> 0,05
$P_{2,3}$	< 0,05		< 0,001
$P_{3,4}$	< 0,001		< 0,001

Активность ААП достоверно ($p < 0,001$) возросла в моче больных 3-й группы в 2,2—3 раза по сравнению с нормой и активностью у больных 1-й и 2-й групп. Достоверного изменения активности ГЛ в 3-й группе не выявлено ($p > 0,05$), хотя у 12 больных этой группы активность ГЛ значительно превышала нормальные величины и в среднем составляла $17,0 \pm 1,3$ нмоль/с/л (при норме $7,5 \pm 0,8$ нмоль/с/л). У больных 4-й группы, у которых содержание белка в моче превышало 0,5 мг/мл, дальнейшего повышения активности НАГ, ГА и ААП не выявлено. Эти показатели остались на уровне величин активности у больных 3-й группы. Однако активность ГЛ несколько возросла ($p < 0,05$).

Анализ полученных данных подтвердил отсутствие у больных ИЗСД 1-й группы диабетической нефропатии, что было показано методами клинического обследования, — не обнаружены признаки нарушения как гломерулярного фильтра, так и канальцевого отдела нефрона. У больных 2-й группы при полном отсутствии доклинических и клинических признаков (клубочковая фильтрация, альбуминурия и протеинурия сохранены в пределах нормы) обнаружены повышенные активности НАГ и ГА в моче,

между которыми выявлена тесная корреляционная зависимость ($r=0,85$; $p < 0,001$). Повышение в моче активностей ферментов только лизосомальной локализации без изменения активностей ферментов других клеточных органелл может свидетельствовать о самых ранних изменениях в канальцах нефрона, которые сопровождаются освобождением содержимого лизосом без нарушения целостности клеток эпителия. Лизосомальные ферменты, оказывая мощнейшее деградирующее воздействие на важнейшие биологические молекулы (белки, полисахариды, липиды) [10], высвобождаясь из лизосом, могут оказывать разрушающее влияние на многие функционирующие биохимические системы клетки, усиливая развитие патологического процесса, что уже наблюдается у больных 3-й группы. У этих больных в присутствии микропротеинурии выявлена уже значительная гиперферментурия. Наряду с еще большим повышением активностей лизосомальных ферментов НАГ и ГА, чем у больных 2-й группы, выявляется повышенная активность ААП, которая достоверно коррелирует с активностью НАГ ($r=0,49$; $p < 0,01$). Повышенная активность ААП в моче больных 3-й группы по сравнению с нормой свидетельствует о разрушении мембран щеточной каймы эпителия у последних [19], а появление повышенной активности ГЛ у ряда больных этой группы — о разрушении эпителиальных клеток. У больных 4-й группы патологические процессы в почках необратимы: высокая протеинурия свидетельствует о поражении базальных мембран гломерулярного фильтра, а повышенный уровень ГЛ в моче — о деструкции клеток эпителия канальцев нефрона.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что определение в моче больных ИЗСД активностей ферментов различной клеточной локализации в эпителии почечных канальцев позволяет оценить степень разрушения клеток эпителия и своевременно выявить наиболее ранние повреждения в проксимальном отделе канальцев нефрона, которые в дальнейшем могут привести к нарушению реабсорбционно-метаболической функции нефрона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаева Н.И., Липецкая И.Я., Творогова М.Г., Титов В.Н. // Лаб. дело. — 1991. — N 1. — С. 9-16.
2. Базарова А.В., Мамаева Г.Г., Карелин А.А. // Пробл. эндокринол. — 1990. — Т. 36, N 3. — С. 87-91.
3. Галенок В.А., Гостинская Е.В., Диккер В.Е. Гемореология при нарушениях углеводного обмена. — Новосибирск, 1987.
4. Дедов И.И., Мухин Н.А., Пальцев М.А. и др. // Тер. арх. — 1989. — Т. 61, N 12. — С. 73-76.
5. Делекторская Л.Н., Ертанов И.Д., Окунев Д.Ю. // Лаб. дело. — 1988. — N 9. — С. 3-8.
6. Иванов Ю.И., Погорелюк Л.Н. Обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах. — М., 1990.
7. Лавренова Т.П. // Лаб. дело. — 1986. — N 7. — С. 430-432.
8. Лавренова Т.П. // Там же. — 1990. — N 7. — С. 4-10.
9. Платонова Л.В., Шоно Н.И., Рабинович С.Э. // Клин. лаб. диагн. — 1995. — N 1. — С. 33-34.
10. Покровский А.А., Тутельян В.А. // Лизосомы. — М., 1976. — С. 181.
11. Почки и гомеостаз в норме и при патологии / Под ред. С.Клара; Пер. с англ. — М., 1987.
12. Серов В.В., Пальцев М.А. // Почки и артериальная гипертензия. — М., 1993. — С. 22.
13. Cantin M., Artizzi M., Luciano M., Gianetto R. // Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.). — 1979. — Vol.

- 162, N 1. — P. 121-127.
14. Hultberg B. // *Clin. chim. Acta.* — 1980. — Vol. 108, N 2. — P. 195-199.
 15. Jung K., Scholz D. // *Clin. Chem.* — 1980. — Vol. 26, N 9. — P. 1251-1254.
 16. Jung K., Pergande M., Schimke E. et al. // *Ibid.* — 1988. — Vol. 34, N 3. — P. 544-547.
 17. Miltenyi M., Korner A., Tulassay T., Szabo A. // *Arch. Dis. Childh.* — 1985. — Vol. 60, N 10. — P. 929-931.
 18. Pesce M.A., Strande C.S. // *Clin. Chem.* — 1973. — Vol. 19, N 11. — P. 1265-1267.
 19. Shimoji N., Kitahaski S., Naka K. et al. // *Metabolism.* — 1987. — Vol. 36, N 3. — P. 277-290.
 20. Shoenberger G., Buser S., Nagraier V. et al. // *Diagnostic Significance of Enzymes and Proteins in Urine* // Eds. U.C. Dubach, U.Schmidt. — Bern, 1979. — P. 122-131.
 21. Watanabe S., Asami T., Sasazaki Y. et al. // *Nephron.* — 1982. — Vol. 32, N 3. — P. 296.

Поступила 24.12.94

ON URINARY ENZYMES IN INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS

L. V. Platonova, S. E. Rabinovich, N. I. Shono, T. G. Dyuzheva, E. I. Galperin

I. M. Sechenov Moscow Medical Academy

In patients suffering from insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) with or without preclinical and clinical signs of diabetic nephropathy, the degree of epithelial cell lesions in the renal tubules was assessed from the urinary activities of enzymes at various sites, such as lysosomal (N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and β -galactosidase (β -GA)), brush edge membranous (alanine aminopeptidase (AAP), and cytosolic (α -glucosidase (α -GL)). Patients from Groups 1 and 2 had no preclinical and clinical signs of nephropathy. In Group 1 patients, the magnitude of enzymuria was not different from that in normalcy. However, Group 2 patients exhibited significant increases in urinary NAG and β -GA activities as compared to Group 1 patients and healthy individuals. In Group 3 patients with microproteinuria from 0.05 to 0.5 mg protein per ml urine, displayed a further enhancement of NAG and β -GA activities as compared to Group 2 patients and significantly higher activity than did Groups 1 and 2 patients and healthy individuals. In Group 4 patients with macroproteinuria of > 0.5 mg/ml, greater increases in the activities of NAG, β -GA, and AAP were not found; however, there was a significant increase in α -GL activity. The findings suggest the varying degrees of epithelial cell damage in the renal tubules in patients of different groups and the possibility of early detection of lesion in the proximal portion of nephronic tubules in IDDM patients as assessed from urinary enzyme levels.