

STUDII CLINICE

IMPORTANȚA DIAGNOSTICĂ A DETERMINĂRII α -GLICOZIDAZEI NEUTRE ȘI A β 2-MICROGLOBULINEI ÎN PIELONEFRITA CRONICĂ

THE DIAGNOSTICAL IMPORTANCE OF DETERMINATION OF NEUTRAL α -GLICOZIDASE AND β 2-MICROGLOBULIN IN CHRONIC PIELONEPHRITIS

Rezumat

Scopul studiului prezent este aprecierea activității procesului inflamator al aparatului tubular renal prin determinarea α -glicozidazei neutre (EC 3.2.1.20) și a β 2-microglobulinei (β 2-M) în urină în pielonefrita cronică (PC), perioada latentă și PC în acutizare. Funcția renală în ambele loturi a fost menținută. Datele obținute demonstrează valori semnificativ crescute față de lotul martor ale α -glicozidazei neutre și un nivel sporit al β 2-microglobulinei în urină în lotul cu PC în acutizare până și după tratament ($p < 0,001$). Aprecierea α -glicozidazei neutre și a β 2-M în urina în PC poate fi utilizată ca markeri simpli ai activității procesului inflamator tubular.

Vera SALI

*Laboratorul Central de Cercetări Științifice,
USMF „Nicolae TESTEMIȚANU”,
Spitalul Clinic Republican*

Summary

The aim of this study was to appreciate the functional statute of tubular apparatus of kidneys by determinate the activity of neutral α -glucozidase enzyme and β 2-microglobulin in urine.

The kidneys function in both groups was saved. The received data, demonstrate meanings much above till comparisons with group of the control in neutral α -glucozidase and β 2-microglobulin in urine at chronic pielonephritis acute phase before and after treatment ($p < 0.001$). The appreciation of neutral α -glucozidase and β 2-microglobulin in urine in chronic pielonephritis can be used as a simple parameter of the inflammatory activity process in tubular apparatus of kidneys.

Actualitate

Afecțiunile renale tubulo-interstițiale, prin cauze infecțioase nespecifice cu caracter acut sau cronic, reprezintă formele cele mai frecvente care deseori generează probleme de diagnostic și de tratament^{1,2,3}. Deși în ultimele decenii s-au înregistrat progrese remarcabile, mecanismele patogene care stau la baza acestor procese sunt încă incomplet cunoscute^{4,6,9}.

De aceea cercetările contemporane sunt orientate spre studierea aprofundată a etiopatogeniei, a particularităților evoluției clinice, a sporirii calitativă a diagnosticului, a eficacității tratamentului și spre posibilitatea de a pronostica apariția recidivelor și a diverselor complicații^{4-7,10,11}, precum și a cronicizării lor.

Sub acest aspect, deosebit de importante sunt cercetările enzimelor, mai ales determinarea activității lor în urină¹⁴. Studiile recente au demonstrat importanța aprecierii activității enzimelor în urină în afecțiunile renale plurietiologice, acute sau cronice, caracterizate histopatologic prin afectarea dominantă a interstițiului și a tubilor renali.^{12,16,17}

Spre deosebire de alte organe, rinichiul are un echipament enzimatic divers și bogat, situat preponderent la nivelul nefrocitelor. În normă se elimină o cantitate redusă de enzime în urină. Orice alterare a funcției tubulare sau glomerulare antrenează o tulburare a reabsorbției tubulare sau scăderea filtratului glomerular, manifestată prin enzimurie. În urină în prezent se apreciază activitatea aproximativ a 70 enzime și izoenzime^{14,15}.

Unii savanți (Dance, Hultberg, V.Păiș etc.) , prin studiile lor au demonstrat în diferite patologii renale o creștere considerabilă a activității unor glicozidaze. Creșterea activității β -galactozidazei și β -N-acetilglucozaminidazei a fost apreciată în diferite forme de diabet juvenil, astfel încât gradul acestor schimbări corespundea gravității maladiei și reflecta gradul afectării renale în diabet. Aprecierea glicozidazelor și a β 2-M în urină la pacienții cu transplant renal se realizează prin teste de diagnostic destul de importante, care reflectă starea de rejet acut⁸. Astfel, unele enzime urinare pot fi considerate markeri ai afectării țesutului renal în diverse nefropatii^{5,10}.

Un interes major la elaborarea testelor pentru depistarea afecțiunilor renale îl prezintă enzimele specifice pentru țesutul renal. O astfel de enzimă este α -glicozidaza neutră (EC 3.2.1.20), care a fost depistată în urina umană, a cărei origine mult timp rămânea incertă. În serul sanguin activitatea acestei enzime este redusă,¹³ dar este prezentă în țesutul renal în cantități mari.

α -Glicozidaza neutră mai poate fi atestată în mucoasa intestinală în cantități destul de reduse, astfel încât concentrația sa nu poate fi supusă aprecierii. În alte țesuturi și organe nu a fost depistată. α -Glicozidaza neutră catalizează reacțiile de scindare a glicogenului, a dextrinelor macromoleculare, a dizaharidelor cu legăturile a-1,2, a-1,3, a-1,4 și a-1,6 glicozidice și manifestă activitate maximală la pH 6,0–7,0¹⁴.

S-a stabilit deci că această enzimă este de origine exclusiv renală, fiind localizată pe marginea „de perie” a celulelor

epiteliale ale canaliculelor proximale și ansa Henle. Lipsește în glomeruli și în alte țesuturi renale. Sub acest aspect, aprecierea α -glicozidazei în urină prezintă interes în diagnosticul leziunilor renale localizate în sectorul tubulo-interstițial¹³. Excreția crescută a α -glicozidazei în urină a fost înregistrată în: pielonefrite cronice, nefropatii diabetice, amiloidoză renală, hidronefroză, hipertonie arterială cu angiopatie renală^{2,9,11,15}.

Cercetările ultimilor ani au adus contribuții importante în ceea ce privește rolul β 2-microglobulinei (β 2-M) în patologia bolilor renale^{5,7,8,12}. Aceasta este o proteină globulară neglicolizată, cu masa moleculară mică – 11,8 kDa. A fost izolată pentru prima dată în 1964 în urina bolnavilor cu patologia Wilson și a fost caracterizată în 1968 de către J.Berggard și A.Bearn. β 2-M în ser și urină se consideră un indice destul de sensibil în afectarea timpurie a țesutului renal. Orice alterare a funcțiilor tubulare va antrena o tulburare a reabsorbției tubulare a β 2-M și vor crește considerabil valorile ei urinare⁵. Conform datelor unor savanți, nivelul β 2-M poate fi aplicat în calitate de criteriu de diagnostic al funcției renale la pacienții cu afecțiuni interstițiale ale rinichilor¹³. De aceea, am considerat oportun studiul activității a-glicozidazei și al nivelului β 2-M în pielonefritele cronice sub aspectul de evaluare a modificărilor funcției tubulare în funcție de gravitatea procesului patologic, dar și în planul definirii criteriilor pentru ameliorarea diagnosticului timpuriu, a tratamentului adecvat și a măsurilor de prevenire a complicațiilor bolii.

Scopul prezentului studiu constă în aprecierea activității procesului inflamator și a stării funcționale a aparatului tubular renal prin determinarea a-glicozidazei neutre și a β 2-M în urină la pacienții cu pielonefrite cronice în acutizare și în formele latente.

Material și metode

În studiu au fost incluși 36 de pacienți cu PC în acutizare (lotul I) și 32 de pacienți cu PC faza latentă (lotul II), spitalizați în Secția Nefrologie a Spitalului Clinic Republican. Vârsta medie a pacienților în loturile studiate a constituit $49 \pm 7,1$ ani în lotul I (28 femei, 8 bărbați) și $47 \pm 6,8$ ani în lotul II (26 femei, 6 bărbați). În ambele loturi de studiu au fost selectați pacienți cu funcția renală menținută. Durata patologiei a variat între 1-7 ani. Lotul martor a fost constituit din 32 de persoane aparent sănătoase (27 femei, 5 bărbați) cu vârsta medie de $49,7 \pm 7,3$ ani, în lipsa datelor clinice caracteristice pielonefritei, cu valori normale ale examenului sumar de urină, cu valori normale ale ultrasonografiei renale, ale organelor abdominale și ale cercetărilor instrumentale la care au fost supuși și pacienți din loturile de studiu.

Diagnosticul clinic a fost confirmat în clinică în baza datelor istoricului bolii, tabloului clinic, rezultatelor cercetărilor de laborator, investigațiilor imagistice (USG rinichilor) și radiologice, cum ar fi ecografia rinichilor, a organelor abdominale, urografia intravenoasă, metodele radionuclide: renografia radioizotopică, scintigrafia renală (studiu dinamic).

Investigațiile biochimice s-au efectuat în laboratorul biochimic al Centrului de Dializă și Transplant Renal SCR și în laboratorul biochimic al LCCȘ, USMF “Nicolae Testemițanu”.

Activitatea a-glicozidazei neutre în urină și nivelul β 2-M în ser și urină s-au studiat în urina de dimineață proaspăt colectată, fără utilizarea conservanților. Probele au fost supuse centrifugării (3000 rot/min) și au fost dializate. Parametrii biochimici de uz curent: proteina totală, Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^+ , Cl^- , fosforul anorganic, nivelul moleculelor medii în ser și în urină etc. au fost stabiliți prin metode cinetice, enzimatic, spectrofotometrice de rutină.

Evaluarea sistemului renal a fost realizată prin următoarele investigații:

1. sumarul urinei
2. urocultură
3. probe funcționale renale care au vizat :
 - creatinina serică, $\mu\text{mol/l}$;
 - creatinina în urină, $\text{g}/24 \text{ h}$;
 - ureea serică, mmol/l ;
 - clearance - ul creatininei, ml/min .

Metoda dată este de bază în explorarea funcțională renală, fiind în măsură să confirme integritatea funcției renale sau să stabilească gradul deficitului funcțional cu acuratețe suficientă.

Pentru relevarea procesului inflamator din rinichi au fost determinate proteina C-reactivă, fibrinogenul și viteza de sedimentare a hematiilor. Activitatea enzimei α -glicozidazei neutre în urină a fost determinată după procedeul A.Petric în modificarea noastră (Certificat de inovator nr.3783 din 05.11.2001, autori Vera Sali, Dumitru Melnic) bazat pe hidroliza substratului para-nitrofenil- α -glucopiranozidului în mediu neutru de către enzima menționată. Activitatea α -glicozidazei neutre și nivelul β 2-M în ser și urină au fost apreciate la internarea bolnavilor și la externarea lor. Rezultatele au fost exprimate în unități pentru 1 mmol de creatinină.

Determinarea proteinuriei s-a realizat în cadrul examenului de rutină în urina proaspăt emisă și în urina din 24 ore (metodă cantitativă).

Nivelul cantitativ al β 2-M în ser și în urină a fost apreciat prin metoda radioimunologică cu aplicarea seturilor de reagenți Rio-Beta-2-Micro- J^{125} (Belarusi) Radioactivitatea, stabilită în probe, a variat invers proporțional cu cantitatea de β 2-M

Tabel 1

Dinamica activității a-glicozidazei neutre și a nivelului β 2-M în urină la bolnavii cu pielonefrita cronică

Indici studiați	PC acutizare		PC latentă		Lotul martor
	internare	externare	internare	externare	
α -Glicozidaza neutră în urină, ($\text{nmol}/\text{s}/\text{mmol}$ creatinină)	$2,96 \pm 0,66^{**}$	$2,13 \pm 0,48^{**}$	$2,16 \pm 0,59^{**}$	$1,41 \pm 0,57$	$1,25 \pm 0,39$
β 2- M (mg/l) în urină	$0,30 \pm 0,04^{**}$	$0,28 \pm 0,05^{**}$	$0,32 \pm 0,08^{**}$	$0,21 \pm 0,04^{**}$	$0,13 \pm 0,02$
β 2-M (mg/l) în ser	$1,97 \pm 0,26^*$	$1,48 \pm 0,13$	$1,45 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,12$	$1,29 \pm 0,30$

Notă: diferențe semnificative față de lotul martor * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$

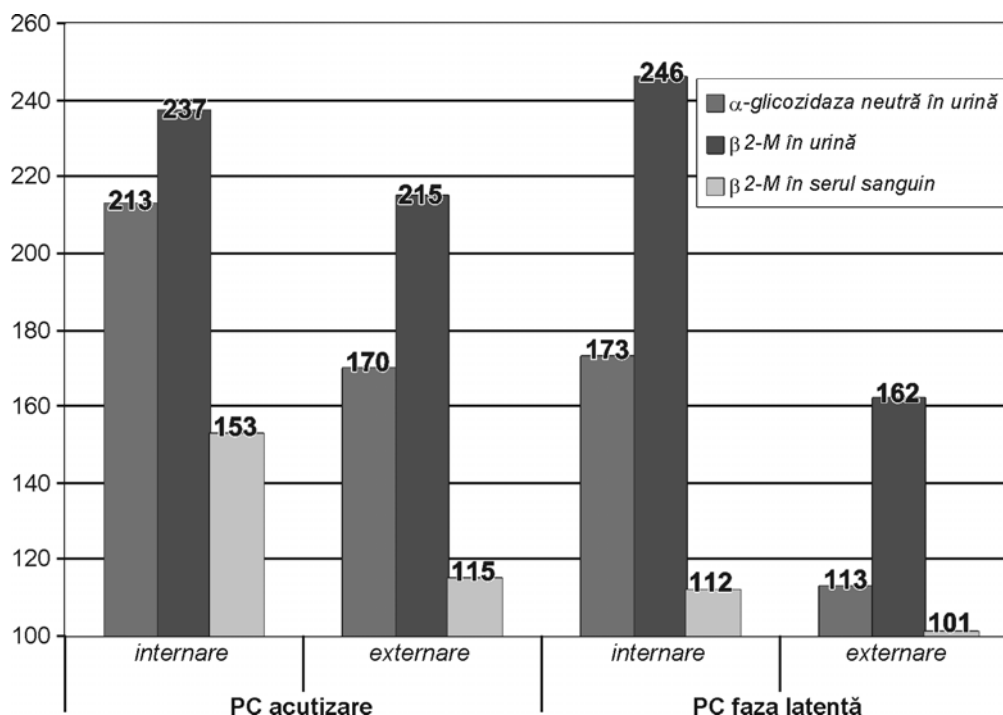


Fig.1. Activitatea a-glicozidazei neutre și nivelul de β 2- M în urină în pielonefrita cronică (în % față de valorile normale)

nemarcată, prezentă în probă. Limita de detecție minimală pentru β 2-M cu această trusă constituie 3 μ g/l. Probele de urină cercetate s-au diluat cu soluție fiziologică în raport de 1:5.

Analiza statistica

Rezultatele au fost analizate statistic utilizându-se programul Stat Soft 6.0.2.15.

Rezultate și discuții

Nu au fost înregistrate diferențe semnificative statistic între loturile studiate în privința nivelului seric al ureei, cretininei, glucozei, colesterolului, electroliților și a altor parametri biochimici.

Au fost analizate și evaluate rezultatele activității a-glicozidazei neutre și nivelul β -2M în ser și în urină în pielonefritele cronice, în funcție de forma maladiei. Aceste date sunt expuse în tabelul și în figura de mai jos.

În baza investigațiilor noastre, efectuate în PC în acutizare, au fost înregistrate valori semnificativ crescute a activității a-glicozidazei neutre în urină la internare $2,96 \pm 0,66$ ($P < 0,001$) nmol/s/mmol creatinină. La externare, (la 7-10 zile de tratament) indicii acestei enzime rămân majorați - $2,13 \pm 0,48$ nmol/s/mmol creatinină ($p < 0,001$), fapt ce confirmă activitatea procesului patologic, determinat de inflamație în sistemul tubular. Valoarea medie a β 2-M în urină în PC în acutizare la internare a constituit ($0,30 \pm 0,04$ mg/l) ($P < 0,001$) și este veridic semnificativă față de lotul martor ($0,13 \pm 0,02$ mg/l). Nivelul β 2-M în urină în primul lot, după tratamentul administrat, rămâne majorat, veridic semnificativ ($0,28 \pm 0,05$ mg/l) comparativ cu subiecții sănătoși.

În lotul II la pacienții cu PC faza latentă determinăm o excreție veridic semnificativă față de valorile normale a a-glicozidazei neutre la internare ($2,16 \pm 0,59$) ($P < 0,001$). La externare indicii a-glicozidazei neutre în urină față de lotul de referință sunt statistic neconcludenți, marcând astfel diminuarea gradului de inflamație în rinichi.

Indicii β 2-M în urină PC latente au fost majorați veridic semnificativ până la tratament ($0,32 \pm 0,08$) ($P < 0,001$). După tratament nivelul β 2-M în urină ($0,21 \pm 0,04$ mg/l), comparativ cu subiecții sănătoși ($0,13 \pm 0,02$ mg/l), rămâne majorat, fiind veridic semnificativ ($P < 0,001$). Acest fapt vorbește despre persistența inflamației tubulare din pielonefritele latente, ceea ce indică necesitatea unui tratament continuu cu uroseptice, antioxidante, dezagregante, tratament fizioterapeutic. Nivelele β 2-M în ser până la tratament și până la externare sunt în limitele normei.

Datele obținute de noi se află în concordanță cu rezultatele cercetărilor unor savanți care consideră că în glomerulonefritele cronice, pielonefrite, amiloidoză α -glicozidaza neutră constituie un criteriu independent în afectarea renală, deoarece activitatea sa nu depinde de gradul de exprimare a proteinuriei^{9,10} și spre deosebire de activitatea altor enzime cum ar fi: lactatdehidrogenaza, N-acetil- β -glucozaminidaza, β -glucuronidaza corelează în mare măsură cu gradul de acutizare al maladiei^{11,16,17}. Excreția urinară înaltă a a-glicozidazei neutre, enzimă localizată pe marginea „de perie” a epiteliului tubilor renali, determinată de noi la bolnavii cu pielonefrite cronice în acutizare și în perioada latentă, indică afectarea pronunțată a aparatului tubular renal care se manifestă prin distrucția marginii „de perie” a epiteliului tubilor renali. Consecința acestui proces distructiv este diminuarea funcției de reabsorbție a aparatului tubular renal, fapt confirmat de creșterea importantă a excreției urinare a β 2-M în loturile de pacienți cu pielonefrite cronice.

Astfel, studiul nivelului α -glicozidazei neutre în urină, completat prin cel al excreției urinare a β 2-M, proteină cu greutate moleculară mică, poate fi considerat criteriu sensibil de apreciere a gradului de afectare a aparatului tubular renal în pielonefritele cronice.

Concluzii

1. Activitatea α -glicozidazei neutre și nivelul β 2-microglobulinei în urină se majorează veridic semnificativ la

pacienții cu pielonefrite cronice în faza de acutizare, aceste valori rămân majorate și după cura de tratament.

2. Dozarile α -glicozidazei neutre și β 2-microglobulinei pot fi considerate markeri sensibili ai activității procesului inflamator tubular în pielonefritele cronice.

3. Aprecierea α -glicozidazei neutre este o metodă neinvazivă, mai simplă în realizare și mai puțin costisitoare în comparație cu costul dozării nivelului β 2-microglobulinei.

Bibliografie

1. **BARSOUM RS:** Chronic kidney disease in the developing world. // N Engl J Med 354: 997-999, 2006.
2. **BAGSHAW SM, LANGENBERG C, HAASE M, WAN L, MAZ CN, BELLOMO R.** Urinary biomarkers in septic acute kidney injury. // Intensive Care Med. 2007; 33(7):1285-96.
3. **CODREANU I., PERICO N, SHARMA SK, SCHIEPPATI A, REMUZZI G.:** Prevention programmes of progressive renal disease in developing nations. // Nephrology 11:321-328, 2006.
4. **DING H, LI K, YANG J, LI X, LU R, GAO W.** Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. Clin Immunol. 2007 May;123(2):227-34.
5. **GATANAGA H, TACHIKAWA N, KIKUCHI Y et all.** Urinary Beta (2)-microglobulin as a possible sensitive marker for renal injury caused by tenofovir disoproxil fumarate. AIDS Res Hum Retroviruses. 2006 Aug;22(8):744-8.
6. **IUDIN IAB, SURZHIKOVA GS, ADAMENKO OB.** Neutral alpha-glucosidase activity in the urine in congenital hydro-nephrosis in children Urol Nephrol (Mosk) 1995 Jan-Feb;(1):10-15.
7. **OETTING WS, ROGERS TB et all.** Urinary beta2-microglobulin is associated with acute renal allograft rejection. Am J Kidney Dis. 2006 May;47(5):898-904
8. **SCHAUB S, WILKINS JA, et all.** Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. Am J Transplant. 2005 Apr;5(4 Pt 1):729-38.
9. **SIMEONI U, SCHINITZLER B, et all.** Specific developmental profiles of lysosomal and brush border enzymuria in the human. Biol Neonate. 1994;65(1):1-6.
10. **TAHA MA, SHOKEIR AA, OSMAN HG, et all.** Obstructed versus dilated nonobstructed kidneys in children with congenital ureteropelvic junction narrowing: role of urinary tubular enzymes. J Urol. 2007 Aug;178(2):640-6. Epub 2007 Jun 14.
11. **THOMAS D. DUBOSE, Jr.** American Society of Nephrology Presidential Address 2006: Chronic Kidney Disease as a Public Health Threat-New Strategy for a Growing Problem. JASN, april 2007, vol 18, n 4, 1038-1045.
12. **БУГРОВА О.В., АКСЕНОВ И.В, БАГИРОВА В.В. , РЫБИНА О.И., ТВЕРДОХЛИБ Н.Ю.** Активность нейтральной альфа-гликозидазы мочи и содержание b2-микроглобулина в крови и моче у больных системной красной волчанкой. Нефрология и диализ. Т.3, 2001г., N2.
13. **ГОЛОВАНОВА О.Е., РЕЗНИКОВ Ю.П., МАКСИМОВ Н.А.** и др. b₂-микроглобулин в сыворотке крови и моче больных интерстициальным поражением почек. // Тер. архив. 1986; 8: 27-29.
14. **ЛАВРЕНЕВА Т.П.** Ферменты мочи и их значение для диагностики поражения почек (обзор литературы). // Лаб. дело. 1990; 7:4-10.
15. **НАГИБОВИЧ О.А.** Дисфункция канальцев при диабетической нефропатии. Медтехника и медизделия №4, ноябрь/декабрь, 2001.
16. **ОКУНЕВ Д.Ю., ЯНУШКЕВИЧ Т.Н., ПОТАПОВА А.В.** и др. Значение определения активности ферментов в моче у больных заболеваниями почек. Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины. М., 1990; 114-119.
17. **ФОМЕНКО Г.В., АРАБИДЗЕ Г.Г., ТИТОВ В.Н.** Клинико-диагностическое значение энзимурии. // Тер. архив. 1991; 6: 142-145.