

МЕМБРАННА ПАТОЛОГІЯ ТА ЕНЕРГЕТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПРИ ПІЕЛОНЕФРИТІ У ДІТЕЙ

В.Е. Маркевич, А.М. Лобода

Медичний інститут Сумського державного університету

Резюме. Стаття присвячена оцінці енергетичного забезпечення нирок за показником активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) та визначенню наявності мембранної патології за рівнем γ -глутамілтранспептидази (ГГТП) в сироватці крові та сечі дітей із піелонефритом (ПН). Активність ЛДГ досліджували кінетичним методом за швидкістю зниження оптичної щільності NADH2. Активність ГГТП визначали уніфікованим методом за «кінцевою точкою». Обстежено 60 дітей з гострим ПН, 30 пацієнтів з хронічним ПН у періоді загострення та 15 — з хронічним ПН у періоді ремісії. Визначення активності ЛДГ у сироватці крові та сечі у разі ПН дозволяє оцінити вираженість ушкодження епітелію проксимального та дистального відділів нефрону та наявність порушень їх енергетичного забезпечення. Вміст ГГТП характеризує вираженість синдрому цитолізу нефротелію у пацієнтів із патологією нирок та свідчить про певну топографію ушкодження.

Ключові слова: піелонефрит, сироватка, сеча, ферменти.

Вступ

Піелонефрит (ПН) — неспецифічне мікробно-запальне захворювання нирок з переважним вогнищевим інфекційно-запальним ушкодженням тубулоінтерстиційної тканини, пов'язане з інфекцією сечових шляхів. Розвиток піелонефриту супроводжується виникненням гомеостатичного дисбалансу внаслідок порушення функції біологічних мембран та процесів енергетичного обміну нефрону. Маркером вказаних порушень є поява ферментурії [4].

Висока активність процесів енергетичного обміну в нирках є необхідною умовою забезпечення видільної функції. Найбільш повно вказані процеси характеризує активність лактатдегідрогенази (ЛДГ). Лактатдегідрогеназа належить до найважливіших клітинних ферментів, що беруть участь у процесі гліколізу. Вона каталізує зворотну реакцію відновлення пірвіноградної кислоти (пірувату) в молочну (лактат) і виступає ключовим ферментом анаеробного дихання в тканинах [3].

Топічне визначення вогнища інфекції та з'ясування інтенсивності запального процесу в нирках набуває особливого значення при виборі тактики ведення пацієнтів. Високою органоспецифічністю щодо ниркової тканини володіє γ -глутамілтранспептидаза. Активність ферменту в епітелії проксимальних ниркових каналців є найвищою в організмі людини, перевищуючи таку в клітинах печінки в 25 разів, а в сироватці крові — в декілька тисяч разів [6].

Гаммаглутамілтрансфераза, або γ -глутамілтранспептидаза (ГГТП), — фермент, що каталізує переміщення γ -глутамілової групи від пептиду або сполук, що містять дану групу, до акцепторного пептиду або амінокислоти. Завдяки цьому ГГТП сприяє транспортуванню амінокислот через мембрану клітини, що забезпечує їх реабсорбцію з первинної сечі [8].

Мета роботи — оцінити енергетичне забезпечення нирок за показниками вмісту лактатдегідрогенази та визначити наявність мембранної патології за рівнем γ -глутамілтранспептидази в сироватці крові та сечі дітей, хворих на піелонефрит.

Матеріали і методи дослідження

Матеріалом для дослідження була периферійна венозна кров дітей з піелонефритом, яку брали шляхом венепункції зранку натщесерце для виключення впливу добових коливань та вживання їжі на рівень ферментемії. Для визначення активності ферментів в сечі проводили її забір в стерильний посуд під час сечовипускання після туалету зовнішніх статевих органів. Для виключення впливу на екскрецію ферментів сечі добових ритмів досліджували лише ранкову порцію сечі, яку збирали о 8–10 годині ранку.

Активність ЛДГ досліджували кінетичним методом за швидкістю зниження оптичної щільності NADH2 при довжині хвилі 340 нм та температурі 37°C з використанням наборів реактивів фірми «Ольвекс». Вміст ГГТП визначали уніфікованим методом за «кінцевою точкою» за швидкістю утворення 5-аміно-2-нітробензоату при довжині хвилі 405 нм та температурі 37°C, використовуючи реактиви фірми «Ольвекс» [1].

Статистична обробка результатів досліджень здійснювалася за допомогою програм Excel та Statistica 6.0. Використовувалися методи варіаційної статистики, придатні для медико-біологічних досліджень [2]. Визначали середньоарифметичне (M), похибку середньоарифметичного (m). За допомогою критерію Стьюдента (t) визначали показник достовірності (P).

Результати досліджень та їх обговорення

Обстежено 60 дітей з гострим піелонефритом (ГПН), 30 пацієнтів з хронічним піелонефритом (ХПН) в періоді загострення та 15 — з ХПН в періоді ремісії, що знаходилися на лікуванні в нефрологічному відділенні Сумської ОДКЛ. Вік дітей складав від 2 до 17 років. До групи порівняння увійшли 30 дітей, що не мали клінічних чи лабораторних ознак патології нирок. Діагноз ПН встановлювався на підставі ретельного клініко-лабораторного обстеження з виявленням властивих клінічних та параклінічних критеріїв згідно Протоколу лікування ПН у дітей (наказ МОЗ України від 20.07.2005 №365).

Таблиця 1

Концентрація лактатдегідрогенази в сироватці крові дітей з піелонефритом, Од/л

Показник	Група порівняння (n=30)	ГПН (n=60)	Загострення ХПН (n=30)	Ремісія ХПН (n=15)
ЛДГ (M±m)	308,29±10,84	1370,13±68,29 p ₁ , p ₂ , p ₃	800,95±39,21 p ₁ , p ₃	346,39±17,94 p ₂

Примітки: p₁ — достовірність відносно групи порівняння (p<0,001); p₂ — достовірність відносно дітей із загостренням ХПН (p<0,001); p₃ — достовірність відносно дітей із ремісією ХПН (p<0,001).

Концентрація γ -глутамілтранспептидази в сироватці дітей з пієлонефритом, нмоль/(с·л)

Показник	Група порівняння (n=30)	Гострий пієлонефрит (n=60)	Загострення хронічного пієлонефриту (n=30)	Ремісія хронічного пієлонефриту (n=15)
ГГТП	18,57±1,64	442,7±33,3 p_1, p_2, p_3	217,9±12,25 p_1, p_3	115,503±9,23 p_1, p_2

Примітки: p_1 – достовірність відносно групи порівняння ($p < 0,001$); p_2 – достовірність відносно дітей із загостренням ХПН ($p < 0,001$); p_3 – достовірність відносно дітей із ремісією ХПН ($p < 0,001$).

Концентрація лактатдегідрогенази в сечі дітей з пієлонефритом (Од/л)

Показник	Група порівняння (n=5)	ГПН (n=42)	Загострення ХПН (n=23)	Ремісія ХПН (n=10)
ЛДГ	2,59±0,71	12,18±1,53 p_1, p_2	11,74±1,98 p_1, p_3	2,41±0,52 p_2

Примітки: p_1 – достовірність відносно групи порівняння ($p < 0,001$); p_2 – достовірність відносно дітей із загостренням ХПН ($p < 0,001$); p_3 – достовірність відносно дітей із ремісією ХПН ($p < 0,001$).

Концентрація γ -глутамілтранспептидази в сечі дітей з пієлонефритом, нмоль/(с·л)

Показник	Група порівняння (n=7)	ГПН (n=36)	Загострення ХПН (n=23)	Ремісія ХПН (n=15)
ГГТП	15,8±2,83	43,43±2,41 p_1, p_2, p_3	139,67±5,36 p_1, p_3	67,5±5,9 p_1, p_2

Примітки: p_1 – достовірність відносно групи порівняння ($p < 0,001$); p_2 – достовірність відносно дітей із загостренням ХПН ($p < 0,001$); p_3 – достовірність відносно дітей із ремісією ХПН ($p < 0,001$).

Активність ЛДГ в сироватці здорових дітей знаходилася в межах нормативних показників визначення за даною методикою (225–450 Од/л при 37°C).

Встановлено, що у дітей з ГПН концентрація ЛДГ у сироватці крові зростала майже в 4,5 рази та була достовірно вищою відносно всіх інших груп обстежених дітей (табл.1).

У період загострення ХПН спостерігали також значне зростання активності ЛДГ в сироватці крові. Її рівень збільшувався у 2,6 рази відносно здорових дітей, однак був достовірно нижчим порівняно з хворими на ГПН. Ремісія ХПН характеризувалася нормалізацією рівня ЛДГ в сироватці. Вміст зазначеного ензиму в періоді ремісії не відрізнявся від значення, властивого групі порівняння.

Нирки є досить енергетично залежним органом. Необхідною умовою забезпечення функції виділення є покриття високих потреб в енергії. В фізіологічних умовах утворення енергії в нирках відбувається переважно за участі кисню (аеробно), завдяки функціонуванню циклу Кребса. У разі гіпоксії в тканинах відбувається активізація альтернативного анаеробного шляху енергетичного забезпечення. За своєю енергоефективністю анаеробний гліколіз значно (в 6 разів) поступається кисневозалежному механізму, але дозволяє на деякий час забезпечити клітини енергією [7].

ЛДГ є цитозольним ферментом, який бере участь у процесах анаеробного перетворення глюкози з утворенням молочної кислоти. Зростання активності ензиму при ПН ілюструє наявність значних порушень енергетичного метаболізму у даної групи пацієнтів. Гіпоксичне uszkodження нирки та енергетичний дисбаланс, можливо, відіграють не менш важливу роль в патогенезі ПН, ніж безпосередня дія інфекційного чинника. Зазначені порушення максимально виражені при ГПН, ілюстрацією чого є найвищий рівень ЛДГ у цієї групи пацієнтів.

Встановлено, що у обстежених дітей групи порівняння показник ГГТП в сироватці крові не відрізнявся від референтного рівня (0–23 нмоль/(с·л)) [5]. Найімовірніше, такий фоновий вміст ферменту у здорових дітей має позаниркове походження (табл.2).

ГПН супроводжувався значним зростанням концентрації ГГТП в сироватці крові. Активність ензи-

му у обстежених дітей зростала у понад 20 разів ($p < 0,001$) та була максимальною відносно всіх інших обстежених груп дітей.

Для загострення ХПН властивий високий вміст ГГТП в сироватці крові (у понад 10 разів вищий від показника у здорових дітей), однак нижчий від рівня у дітей з ГПН. Для ремісії ХПН властиве достовірне зниження ферментемії. Рівень ГГТП у стадії ремісії перевищував відповідне значення в групі порівняння більше, ніж у 6 разів, хоча і був значно нижчим від показника у разі загострення.

Отже, висока концентрація ГГТП властива дітям з усіма варіантами перебігу захворювання, досягаючи максимальних значень при ГПН. Значна ферментемія пов'язана із високою швидкістю вивільнення ензимів з клітин ниркових канальців внаслідок uszkodження клітинної мембрани на тлі запалення, ішемії, дистрофії чи некрозу. Зважаючи на цитозольну локалізацію ферменту 4,6, лише значна деструкція мембрани або загибель клітини буде призводити до зростання його концентрації в сироватці крові. Таким чином, визначення активності даного ензиму може характеризувати ступінь вираженості синдрому цитолізу нефротелію у пацієнтів із патологією нирок. Синдром цитолізу найбільш властивий для ГПН або загострення хронічного. Ремісія захворювання супроводжується зменшенням його вираженості.

Таким чином, визначення сироваткового вмісту ГГТП є найбільш чутливим індикатором глибини ураження нефротелію та швидкості його відновлення.

Рівень ензимурії дослідили у 48 дітей з ГПН, 23 пацієнтів з ХПН в періоді загострення, 15 – з ХПН в періоді ремісії та 20 здорових дітей.

Активність ЛДГ визначили в сечі 42 хворих (87,5%) на ГПН. У групі порівняння невисокий вміст ЛДГ виявлено лише у 5 (25%) дітей ($p < 0,05$). Поява даного ферменту в сечі здорових дітей пояснюється неповною реабсорбцією його білкових компонентів в канальцях нирок. При фізіологічній протеїнурії в сечу можуть надходити слідові кількості білків як низької, так і високої молекулярної маси [9].

Встановлено, що ГПН супроводжується достовірним підвищенням рівня ЛДГ в сечі ($p < 0,001$). Активність ЛДГ у пацієнтів з ГПН була майже в 5 разів

вищою, ніж у дітей групи порівняння. При цьому коливання вмісту ЛДГ в сечі у хворих на ГПН складало від 3,2 до 25,6 Од/л.

Показник активності ЛДГ у сечі при загостренні ХПН був таким самим, що і в пацієнтів з ГПН. При цьому у сечі фермент визначався у всіх обстежених пацієнтів (табл.3).

Ремісія пієлонефриту супроводжується нормалізацією рівня ЛДГ у сечі. При цьому нульовий вміст ферменту встановлено у 2/3 обстежених дітей. Активність ензиму у решти пацієнтів складала $2,41 \pm 0,52$ Од/л, що було достовірно нижче ($p < 0,001$), ніж при загостренні захворювання та при його гострому перебігу.

Оскільки близько 70% ЛДГ надходить в сечу з проксимального та дистального відділів нефрону, значне ураження саме цих його відділів має супроводжуватися підвищенням її рівня [4,9]. Зважаючи на цитозольну локалізацію ензиму, висока активність його в сечі є проявом вираженого uszkodження епітеліальних клітин ниркових каналців.

Таким чином, визначення активності ЛДГ в сироватці крові та, особливо, в сечі у разі ПН дозволяє оцінити вираженість uszkodження епітелію проксимального та дистального відділів нефрону та наявність порушень їх енергетичного забезпечення.

Концентрація ГГТП визначалася в сечі 36 (75%) хворих на ГПН. Серед дітей групи порівняння вміст ГГТП знайдено лише у 7 (35%) дітей ($p < 0,05$). Наявність даного ензиму в сечі здорових дітей пояснюється його локалізацією в щітинковій облямівці епітелію каналців. Внаслідок цього в процесі оновлення цитоплазматичних мембран можливе потрапляння ферменту в сечу [4].

Виявлено, що ГПН супроводжується достовірним підвищенням рівня ГГТП в сечі ($p < 0,001$). Активність ГГТП у пацієнтів з ГПН була майже в 3,2 рази вищою, ніж у дітей групи порівняння.

При загостренні ХПН у всіх обстежених пацієнтів було виявлено високий рівень ГГТП, який був достовірно вищим ($p < 0,001$) від відповідного показника у осіб з ГПН та у здорових дітей. Концентрація ГГТП в сечі при загостренні ПН у понад тричі перевищувала вміст даного ензиму при гострому перебігу захворювання та майже в 9 разів – активність у здорових дітей (табл.4).

З'ясовано, що в період ремісії ХПН виділення ГГТП із сечею зменшується удвічі, досягаючи значення $67,5 \pm 5,9$ нмоль/(с·л). Але вказане значення все ж достовірно перевищує ($p < 0,001$) показники, характерні для дітей з ГПН, та рівень групи порівняння.

Оскільки близько 2/3 ГГТП локалізовано в щітинковій облямівці звивистих каналців нефрону, тому ураження саме цих відділів буде супроводжуватися появою ферментурії. Близько 1/3 ферменту має внутрішньоклітинну локалізацію в комплексі Гольджі та лізосомах, тому висока активність ГГТП в сечі може бути проявом вираженого uszkodження епітеліальних клітин ниркових каналців [4,10].

Чутливість кількісного визначення ГГТП в сечі при ГПН досить висока. Це недивно, враховуючи частково внутрішньоклітинне розміщення ферменту в структурах комплексу Гольджі і лізосомах. Напевно, підвищення рівня ензиму при ГПН визначається переважним uszkodженням щітинкової облямівки. Крім того, пацієнтам з ГПН властива висока ферментемія (див. табл. 2). Вона може бути пов'язана зі значною деструкцією базальної мембрани епітелію ниркових каналців при гострому запаленні, що спричиняє надходження лівової частки ензиму саме в сироватку, а не в сечу.

При ХПН метод визначення даного ферменту в сечі має високу чутливість. Значна концентрація біосполуки при загостренні ХПН обумовлена дестабілізацією клітинних мембран з подальшим виходом в сечу внутрішньоклітинних органел, що містять даний ензим. Але навіть у ремісію захворювання спостерігається висока активність ГГТП, що може бути показником збереження мембранної патології. При ХПН, напевно, залишаються і зміни базальної мембрани проксимальних каналців, ілюстрацією чого є певна ферментемія. Відзначимо, що у осіб з ХПН рівень екскреції ензиму з сечею складає приблизно половину від його вмісту у сироватці крові.

У пацієнтів з клініко-лабораторними ознаками ремісії вміст ГГТП залишався на високому рівні. Підвищена концентрація ензиму свідчить про збереження мембранної патології, структурно-функціональних та метаболічних порушень епітелію проксимального відділу нефрону, незважаючи на відсутність інших клінічних та лабораторних ознак активності процесу. Наявність вказаних змін може вимагати продовження застосування терапевтичних заходів до нормалізації рівня ГГТП. Визначення активності ГГТП у сироватці крові та сечі може застосовуватися для встановлення глибини та стійкості ремісії у дітей з ХПН.

Отже, підвищений рівень ГГТП може свідчити про певну топографію ураження нефрону, ступінь пошкодження та швидкість відновлення нефротелію, що важливо для науково обґрунтованого патогенетичного лікування.

Перспективним є визначення залежності ферментної активності від тривалості перебігу ПН та стану ниркової функції.

Висновки

1. У разі ПН виникають значні порушення енергетичного забезпечення нирок, свідченням чого є високий рівень ЛДГ в сироватці крові.
2. Активність ГГТП характеризує вираженість синдрому цитолізу нефротелію у пацієнтів із патологією нирок.
3. Дослідження рівня ГГТП в сироватці крові та сечі є необхідним компонентом комплексного лабораторного обстеження для підтвердження ремісії у дітей з хронічним пієлонефритом.

Література

1. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. / В. С. Камышников. — Минск : Беларусь, 2002. — Т. 1. — 495 с.
2. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel // С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. — К. : МОРИОН, 2001. — 408 с.
3. Назаренко Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований // Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. — М. : Медицина, 2000. — 544 с.
4. Нікуліна Г. Г. Ферменти маркери патології клітинних мембран при захворюваннях нирок / Г. Г. Нікуліна, Л. В. Король, Л. А. Мигаль // Укр. журн. нефрол. та діалізу. — 2004. — № 1. — С. 30–33.
5. Справочник по лабораторным методам исследования / [под ред. Л. А. Даниловой]. — СПб. : Питер, 2003. — 736 с.
6. Calbrera-Abreu J. C. γ -Glutamyltransferase: value of its measurement in paediatrics / J. C. Calbrera-Abreu, A. Green // Ann. Clin. Biochem. — 2002. — Vol. 39. — P. 22–25.
7. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry / [ed. Pamela C. Champe, Richard A. Harvey]. — 3rd ed. — Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2005. — 534 p.
8. Okada T. Crystal structures of gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate / Okada T., Suzuki H., Wada K. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — Vol. 103, № 17. — P. 6471–6476.
9. Oxford Textbook of Clinical Nephrology / ed. A. M. A. Davison, J. S. Cameron, J.-P. Grunfeld [et al.]. — 3rd ed. — Oxford University Press. — 2005. — 3048 p.
10. Whitfield J. B. Gamma glutamyltransferase / J. B. Whitfield // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. — 2001. — Vol. 38, № 4. — P. 263–355.

МЕМБРАННАЯ ПАТОЛОГИЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРИ ПИЕЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ

В.Э. Маркевич, А.Н. Лобода

Резюме. Статья посвящена оценке энергетического обеспечения почек по показателю активности лактатдегидрогеназы (-ЛДГ) и определению наличия мембранной патологии по уровню γ -глутамилтранспептидазы (ГГТП) в сыворотке крови и моче детей с пиелонефритом (ПН). Активность ЛДГ исследовали кинетическим методом по скорости снижения оптической плотности НАДН₂. Активность ГГТП определяли унифицированным методом по «конечной точке». Обследовано 60 детей с острым ПН, 30 пациентов с хроническим ПН в периоде обострения и 15 — с хроническим ПН в периоде ремиссии. Определение активности ЛДГ в сыворотке крови и мочи в случае ПН позволяет оценить выраженность повреждения эпителия проксимального и дистального отделов нефрона и наличие нарушений их энергетического обеспечения. Содержание ГГТП характеризует выраженность синдрома цитолитического нефротелия у пациентов с патологией почек и свидетельствует об определенной топографии повреждения.

Ключевые слова: пиелонефрит, сыворотка, моча, ферменты.

MEMBRANE PATHOLOGY AND ENERGETIC PROVIDING IN CHILDREN WITH PYELONEPHRITIS

V.E. Markevich, A.M. Loboda

Summary. The article is devoted the estimation of the energetic providing of kidneys after the index of activity of lactatdehydrogenase (LDH) and the detection of membrane pathology after level of gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in the serum of blood and urine of children with a pyelonephritis (PN). Activity of LDH was probed by a kinetic method after speed of decrease of absorbency of NADH₂. Activity of GGT was determined by the compatible method «to the eventual point». There were inspected 60 children with acute PN, 30 patients with chronic PN in the period of exacerbation and 15 — with chronic PN in the period of remission. Determination of the activity of LDH in serum and urine in the case of PN helps to evaluate severity of damage of the epithelium of proximal and distal part of nephron and the existence of violations of energy supply. Content of GGT characterizes expressed of syndrome of cytolysis of nephrothelium at patients with kidney pathology and testifies about definite topography of damage.

Key words: pyelonephritis, serum of blood, urine, enzymes.