



МЕЛЬНИК А.А.
Специализированный медицинский центр «Оптима-Фарм», г. Киев, Украина

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ N-АЦЕТИЛ- β -D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ КАК РАННЕГО МАРКЕРА ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

Резюме. При многих заболеваниях почек N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (NAG) экскретируется в моче в больших количествах. Значительное увеличение активности NAG отмечено при первичном и вторичном повреждении почек, отравлении тяжелыми металлами, трансплантации почек, опухоли почек, гипертензии, преэклампсии у беременных, диабетической нефропатии, поликистозе, гломерулонефрите. Разработаны коммерческие наборы для измерения активности NAG с использованием колориметрического (биохимического) и иммуноферментного (ELISA) методов исследования.

Ключевые слова: повышение активности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы в моче, диабетическая нефропатия, поликистоз, преэклампсия у беременных, гломерулонефрит, колориметрический и иммуноферментный методы определения активности NAG в моче.

Почечная недостаточность — это патологическое состояние, при котором почки частично или полностью утрачивают способность поддерживать постоянство химического состава внутренней среды организма, что приводит к нарушению водно-электролитного и кислотно-щелочного баланса, расстройству гемостаза, азотемии. В результате в организме нарушаются содержание и распределение воды и солей, задерживаются нелетучие кислоты и азотистые продукты обмена. Возникают условия для артериальной гипертензии, анемии, кровоточивости, изменяется гормональная регуляция и др. Различают острую и хроническую почечную недостаточность (рис. 1).

Диагностика почечной патологии, особенно на ранних стадиях, является чрезвычайно важной и актуальной проблемой для современной урологии и нефрологии. Одним из перспективных направлений является исследование специфических белков, которые указывают на повреждение почек. За последнее десятилетие для выявления повреждения почек широкое распространение получили лабораторные тесты, основанные на определении в моче

уникальных белков-биомаркеров. В настоящее время в моче и сыворотке крови выделено более 60 биомаркеров для оценки нарушения функции почек. Для того чтобы биомаркер имел значимость для клиники, существуют определенные критерии и требования [1, 2]. Идеальный биомаркер должен обладать следующими характеристиками:

- определяться в легкодоступных образцах биоматериала (кровь или моча);
- быстро анализироваться с использованием стандартизированных методов;
- должен быть высокочувствительным и специфичным с широким диапазоном динамических изменений;

Адрес для переписки с автором:
Мельник Александр Александрович
E-mail: amelnik_@i.ua

© Мельник А.А., 2016
© «Почки», 2016
© Заславский А.Ю., 2016

- значимым для прогнозирования клинических исходов;
- пригодным для мониторинга хода лечения;

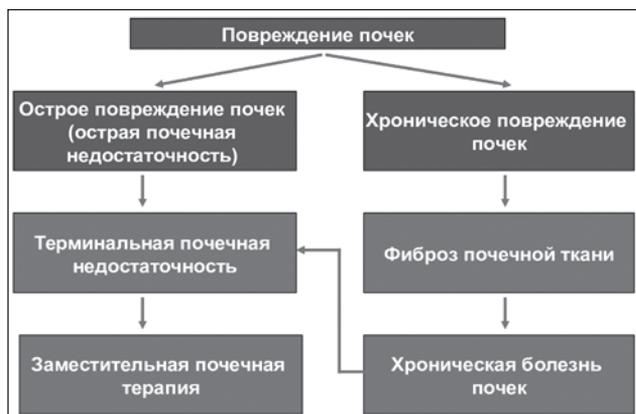


Рисунок 1. Современные представления о повреждении почек

- определяющим основное место повреждения почечной ткани;

- отражающим этиологию повреждения почки.

Биомаркеры сгруппированы согласно их связи с видом и механизмом повреждения почки [3]. Классификация почечных биомаркеров представлена в табл. 1.

В последнее время для выявления тубулоинтерстициального повреждения почек широкое распространение получили лабораторные тесты, основанные на определении в моче белков-биомаркеров, которые продуцируются клетками проксимальных канальцев в ответ на различные повреждающие стимулы и поступают в просвет нефрона (NAG, NGAL, KIM-1, кластерин, GST- α , β_2 -микроглобулин, остеоопонтин, цистатин С, нетрин-1, RBP, IL-18, HGF, CYR61, NHE-3, фетуин-А, альбумин) (рис. 2). Из них наиболее специфичным маркером считается N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (N-acetyl- β -D-glucosaminidase — NAG).

Таблица 1. Классификация почечных биомаркеров (патофизиологическая, топическая и рабочая классификации)

Патофизиологическая классификация		
1	Биомаркеры почечной функции	Креатинин, клиренс креатинина, мочевины, цистатин С, Mg ²⁺ , ангиотензиноген мочи
2	Биомаркеры оксидативного стресса	Продукты перекисного окисления липидов (8(A2)-изопростан, 4-OH-2-ноненал), продукты деградации поврежденной ДНК (8-OH-dG), конечные продукты гликилирования AGE (пентозидин)
3	Биомаркеры структурного и клеточного повреждения	Маркеры повреждения подоцитов (подоцитурия, нефрин, подоцин, подокаликсин), маркеры повреждения тубулоинтерстиция (NGAL, NAG, KIM-1, L-FABP), экскреция альбумина с мочой
4	Маркеры иммунного ответа	Иммуноглобулины (IgG, экскреция IgA, IgM с мочой), компоненты комплемента (C3d, C4d), хемокины (MCP-1, IP-10, CXCL 16, MIF), противовоспалительные медиаторы (VCAM-1, IL-18, TNFR-1)
5	Маркеры фиброза	TGF- β , CTGF, Big-H3, коллаген IV типа
6	Маркеры апоптоза	Аннексин V
Топическая классификация		
1	Клубочек	Альбумин, цистатин С сыворотки, α_1 -микроглобулин, β_2 -микроглобулин и др.
2	Проксимальный каналец	NAG, NGAL, KIM-1, L-FABP, цистатин С мочи, IL-18 и др.
3	Дистальный каналец	GST, NGAL
4	Собирательная трубка	Калибиндин D28
5.	Петля Генле	Остеопонтин, NHE-3
Рабочая классификация		
1	Белки, экспрессия которых повышается	NGAL, KIM-1, L-FABP, IL-18
2	Функциональные маркеры	Цистатин С сыворотки
3	Низкомолекулярные белки мочи	Цистатин С мочи, α_1 -микроглобулин, β_2 -микроглобулин
4	Внутриклеточные ферменты	NAG, GST- α , GST-p, ГТПП, ЩФ

Примечания: NGAL — нейтрофильный желатиназоассоциированный липокалин, KIM-1 — молекула почечного повреждения, IL-18 — интерлейкин-18, L-FABP — печеночный белок, связывающий жирные кислоты, GST — глутатион-S-трансфераза, NHE-3 — натрий-водородный обменник 3, TGF- β_1 — фактор роста опухолей β_1 , CTGF — фактор роста соединительной ткани, NAG — N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза, ГТПП — гамма-глутамилтранспептидаза, ЩФ — щелочная фосфатаза.

Общая характеристика и свойства фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы

NAG (EC: 3.2.1.30) — лизосомальный фермент, присутствующий во многих тканях организма и являющийся наиболее активным ферментом из всех глюкозидаз, обнаруженных в лизосомах клеток [4, 5] (рис. 3).

Наиболее высокая активность NAG выявлена в почках, где фермент секретируется эпителием проксимальных канальцев и участвует в деградации мукополисахаридов и гликопротеинов. Фермент расщепляет химические гликозидные и аминокислотные связи сахаров, которые образуют структурные компоненты во многих тканях. Это необходимо для утилизации различных частей клетки, включая клеточную мембрану. В норме из-за высокой молекулярной массы (~ 140 кДа) NAG не проходит через гломерулярный барьер. При повреждении клеток эпителия происходит высвобождение NAG, что приводит к увеличению концентрации фермента в первичной моче (рис. 4).

Повышение активности NAG в моче рассматривается как специфический маркер раннего, субклинического повреждения проксимальных канальцев и окружающей их соединительной ткани при острых и хронических заболеваниях почек [6]. NAG стабилен в моче, устойчив к изменению pH и температуры, имеет несколько изоферментов, отличающихся по своей локализации в организме. Так, при повреждении почек наблюдается увеличение общей активности фермента и его

В-изоформы в моче [7]. Активность NAG в моче значительно повышается при первичном и вторичном повреждении почек, отравлении тяжелыми металлами, трансплантации почек, опухоли почек, гипертензии, преэклампсии, что происходит задолго до изменения показателей тестов, применяемых для оценки функций почек [8]. При изучении NAG в моче было установлено отсутствие корреляции между активностью фермента и уровнем протеинурии, скорости клубочковой фильтрации, экскреции креатинина с мочой, β₂-микропротеинурией. Так как данный показатель является исключительно стабильным, не изменяется у пациентов с постуральной протеинурией, не зависит от бактериального загрязнения мочи, отсутствия зависимости от уровней лейкоцит- и эритроцитурии, его принято считать наиболее точным и широко распространенным маркером

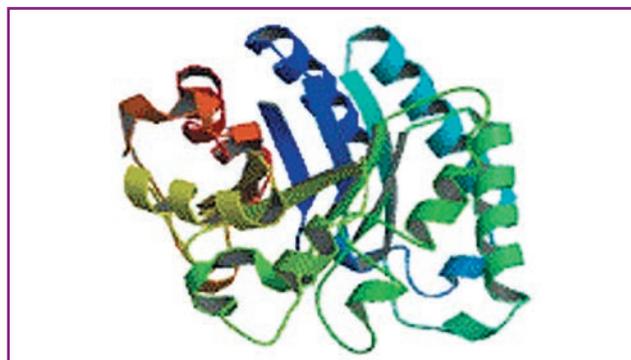


Рисунок 3. Структура N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы

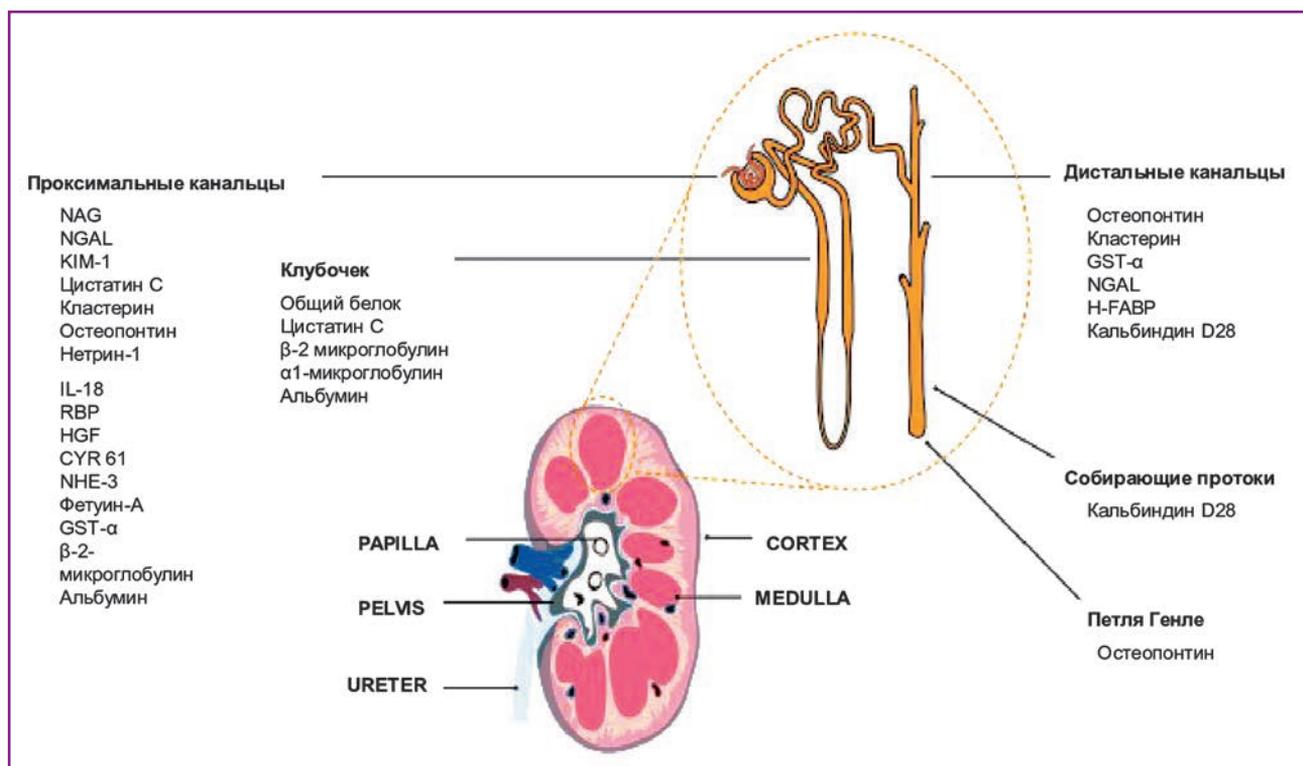


Рисунок 2. Основные белки-биомаркеры, продуцируемые клетками в ответ на повреждение почки

тубулярного повреждения почек. Активность NAG хорошо коррелирует с гистологическими признаками травмы проксимальных канальцев и служит маркером, отражающим эффективность лечения. Введение крысам токсинов, повреждающих проксимальные канальцы, таких как гентамицин и ртуть, вызывает значительное увеличение концентрации NAG в моче [9, 10]. В экспериментах на животных, которые служили моделями нефротоксичности, активность NAG возвращается к исходному уровню при применении антиоксидантной терапии [11]. В исследовании J. Westhuyzen и др. [12] было показано, что концентрация в моче NAG является достаточно чувствительным тестом при остром повреждении почек у взрослых. NAG в моче ингибируется мочевиной, промышленными растворителями и тяжелыми металлами [13, 14]. Увеличение экскреции NAG отмечено при острых заболеваниях почек различной этиологии, после операций на сердце и трансплантации почки [15–17]. Повышенная экскреция NAG в моче наблюдается при диабетической нефропатии [18].

Диагностическое значение N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы при различных нарушениях функции почек

1. NAG и диабетическая нефропатия у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа

Диабетическая нефропатия (ДН) была подробно изучена датским ученым С. Mogensen и др. [19, 20]. Эти классические исследования показывают, что у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа (СД1) ДН

развивается после 10 лет от начала заболевания. В начале заболевания ДН отмечается развитие микроальбуминурии (МАУ) (более 30 мг/сутки), которая в дальнейшем прогрессирует до макроальбуминурии (более 300 мг/сутки) со снижением скорости клубочковой фильтрации и заканчивается терминальной почечной недостаточностью [21]. Однако данные последних исследований показывают, что альбуминурия является очень вариабельным показателем и может не проявляться у некоторых больных, имеющих прогрессивное развитие ДН [22–24]. К сожалению, гистопатологическое исследование, являющееся «золотым стандартом», редко используется на практике, так как для этого требуется проведение биопсии почки у пациентов с СД. Повреждение почки при диабетической нефропатии происходит с развитием конкретного сосудистого поражения (рис. 5).

В настоящее время изменились возможности и стандарты диагностики диабетической патологии почек благодаря внедрению в медицинскую практику новых методов лабораторной диагностики [25]. Современные скрининговые тесты позволяют выявлять ДН только 1-й клинической стадии — стадии микроальбуминурии, пропуская при этом начальные структурные и функциональные нарушения, которые развиваются задолго до повышения экскреции альбумина. Следует отметить, что экскреция альбумина с мочой может зависеть от нескольких факторов, таких как концентрация предсердного натрийуретического пептида в плазме, аргинина, вазопрессина, ангиотензина II, альдостерона, глюкозы в крови натощак, гликированного гемоглобина, артериального давления [26]. Поэтому выделение альбумина с мочой может

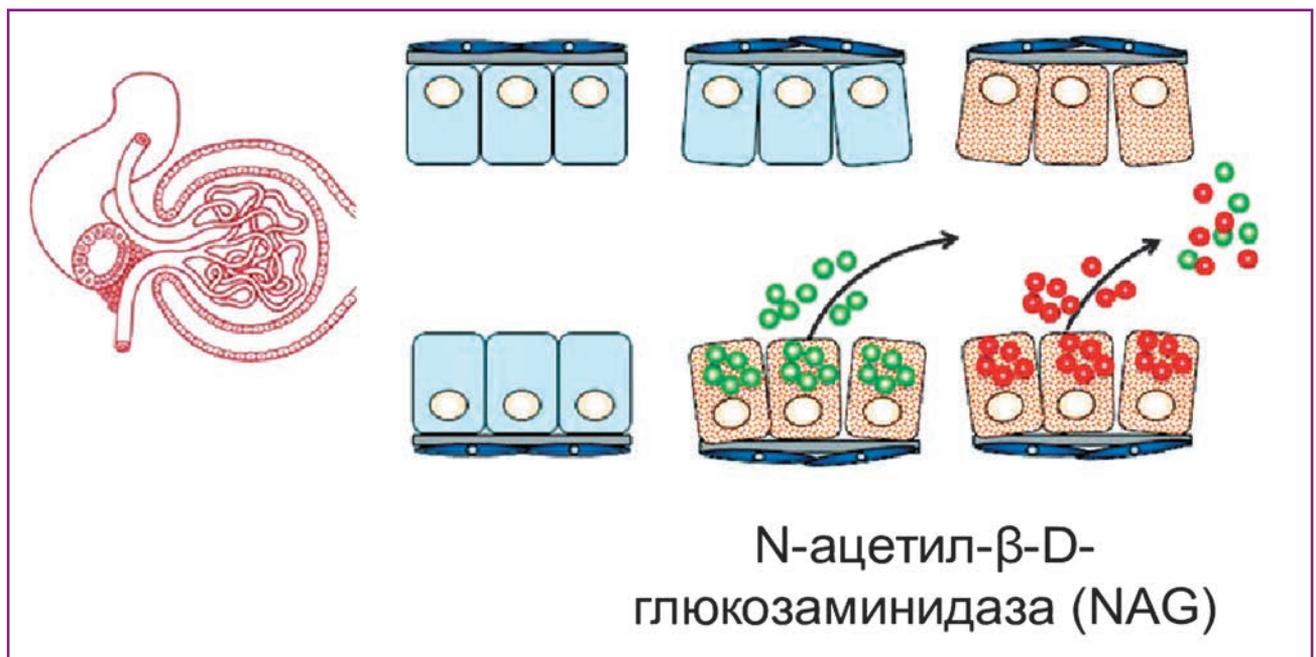


Рисунок 4. NAG секретируется клетками проксимальных канальцев путем экзоцитоза через люминальные мембраны в канальцевый просвет после повреждения клеток и выделяется с мочой

изменяться у отдельных пациентов. Кроме того, существуют межиндивидуальные вариации, которые достигают 47 %. С учетом этих факторов все результаты, которые изначально были положительными для альбуминурии, должны быть в дальнейшем подтверждены исследованием повторной, второй пробы, собранной в другой день, а в случае расхождений между первым и вторым образцом мочи необходимо проведение третьего исследования [27]. Появление МАУ уже свидетельствует о наличии склероза не менее 20–25 % нефронов, а прогрессирование до стадии макроальбуминурии — о потере 50–70 % клубочков, что подтверждает необратимое поражение почек, когда эффективность проводимой терапии крайне ограничена и прогрессивное снижение фильтрационной функции становится неизбежным. Наиболее ранние признаки поражения почек можно обнаружить уже в первые 5 лет от начала заболевания СД1 [28]. По мнению многих исследователей, именно в этот период начало профилактических мероприятий с целью предупреждения прогрессирования диабетической нефропатии является наиболее эффективным.

Во многих научных работах показано, что увеличение экскреции NAG в моче выявляется еще до повышения уровня альбуминурии и прогрессивно возрастает с появлением МАУ [29]. Согласно данным V. Vaidya и др. [30], более низкое содержание NAG у больных СД1 с ДН на стадии МАУ является

предиктором последующего снижения уровня альбуминурии до нормы по сравнению с пациентами с высоким содержанием NAG в моче, у которых МАУ прогрессировала до макроальбуминурии. В исследовании E. Kern и др. [31] проводилось измерение концентрации NAG в моче у больных СД1 с МАУ и макроальбуминурией по сравнению с группой контроля (здоровые пациенты). Было выявлено, что экскреция NAG — независимый предиктор развития МАУ и макроальбуминурии с высоким уровнем значимости. По данным этих исследователей, риск макроальбуминурии увеличивается более чем в 2 раза на каждые 50 % повышения в моче активности NAG от исходного уровня, а также возрастает почти на 9 % при каждом увеличении единицы NAG в моче от начального уровня до появления макроальбуминурии. На основании этих данных был сделан вывод о том, что у пациентов с СД1 измерение NAG в моче может служить более информативным маркером ДН, чем исследование уровня альбуминурии. A. Mohammadi-Karakani и др. [32] подтвердили, что экскреция NAG в моче является более ранним маркером поражения почек, чем МАУ и снижение фильтрационной функции. В исследовании диабетической нефропатии G. Sheira и др. [33] обнаружили повышенные значения NAG в моче по сравнению с контрольной группой. Было зафиксировано, что даже при отсутствии каких-либо клинических признаков микрососудистых осложнений мочевого экскреция NAG неизменно

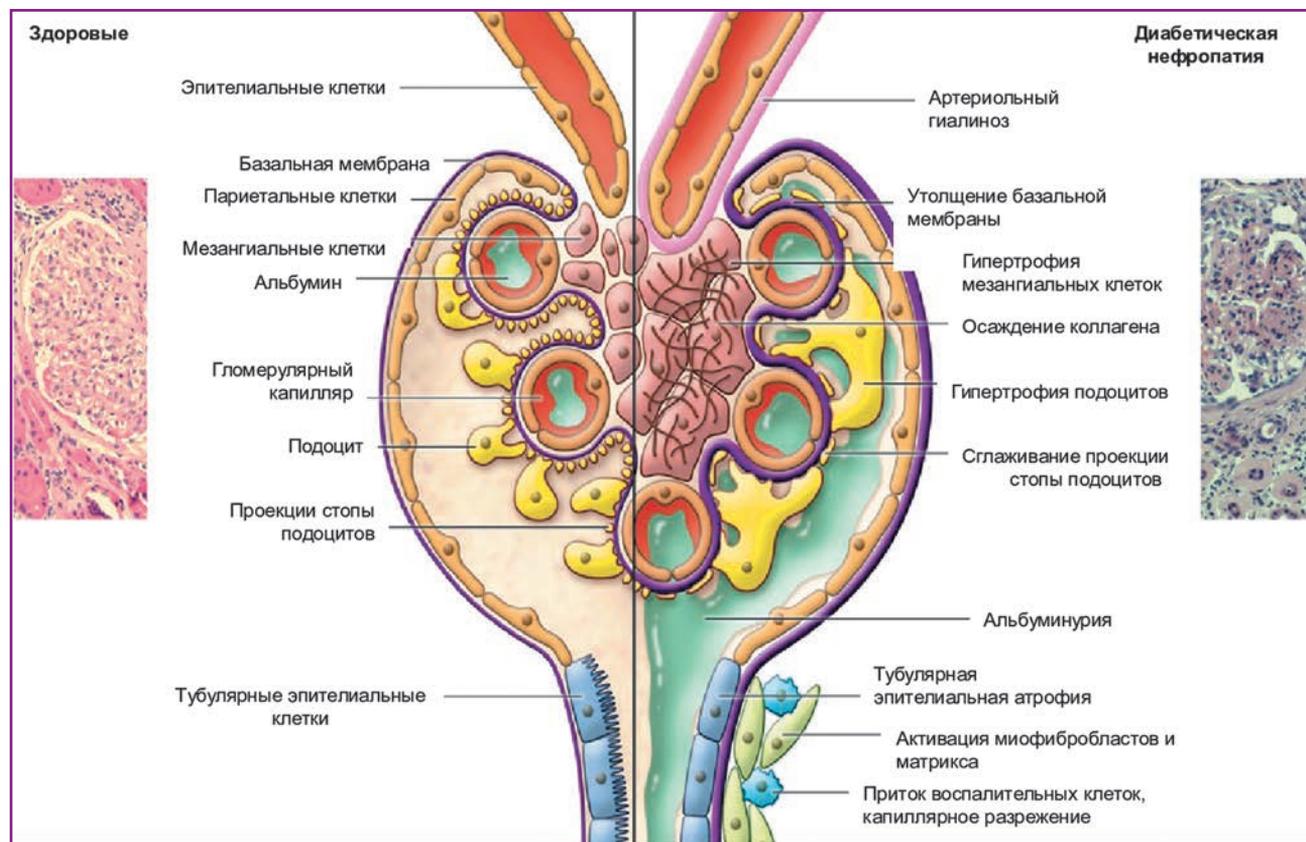


Рисунок 5. Повреждение почки при диабетической нефропатии

повышена, что указывает на субклиническую дисфункцию почечных канальцев и может проявляться еще до возникновения клубочкового повреждения. Эти результаты согласуются с результатами других исследований [34, 35], которые определили, что изменения в активности NAG в моче могут отражать активность заболевания, а также остаточную функциональную способность почек. В работе J. Kuźniar и др. [36] показано, что увеличение экскреции NAG при протеинурических заболеваниях клубочков может происходить даже при отсутствии морфологических признаков повреждения канальцев клеток, что, вероятно, отражает повышенную активность лизосом этих клеток в связи с повышенным захватом белков. J. Navarro и др. [37] установили, что изменения активности NAG при микроальбуминурии, вероятно, происходят потому, что тубулярные клетки могут реабсорбировать повышенное количество альбумина. Кроме того, F. Nauta и др. [38] установили, что NAG в моче повышается в 9 раз у нормоальбуминемических пациентов с диабетом по сравнению с контрольной группой.

2. NAG и диабетическая нефропатия у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа

Группа исследователей из Аргентины [39] обнаружили, что уровни NAG в моче были значительно увеличены у пациентов с МАУ по сравнению с пациентами, имеющими нормоальбуминурию. Наблюдалась значительная корреляция между экскрецией NAG и альбумино-креатининовым коэффициентом (АКК), что подтверждает предыдущие исследования, проведенные у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (СД2) [40–42]. Несмотря на относительно небольшое количество пациентов в данном исследовании, ученые все же констатировали, что уровень NAG является повышенным у больных СД2 с микроальбуминурией. Эти данные свидетельствуют о возможности использования показателя уровня NAG в моче в качестве дополнительного маркера для выявления раннего повреждения почек у больных СД2. В другом исследовании (S. Kim и др. [43]) были сделаны следующие основные выводы:



Рисунок 6. Здоровая почка и поликистоз почки

1. Уровни NAG в моче показали положительную корреляцию с уровнем АКК.

2. Уровень NAG в моче может лучше отражать снижение скорости клубочковой фильтрации.

3. Увеличение активности NAG в моче связано с гликированным альбумином и стимулируется постпрандиальной глюкозой у пациентов с СД2.

4. Уровень NAG положительно коррелирует с возрастом и длительностью сахарного диабета и обратно коррелирует с индексом массы тела.

Что касается уровня NAG мочи в сочетании с альбуминурией, то хорошо известно, что эти уровни всегда выше у пациентов со значительной альбуминурией [44–47]. В отличие от обычной линейной зависимости между уровнем NAG в моче и уровнем альбуминурии первый значительно увеличен у пациентов с нормальной или умеренной альбуминурией среди больных СД2 по сравнению с пациентами без сахарного диабета. A. Tanaka и др. [48] показали, что у 62 % пациентов с СД2 с нормальной или умеренной альбуминурией значительно увеличен уровень NAG в моче. Ученые сделали вывод, что показатель NAG в моче является более чувствительным маркером по сравнению с альбумином для раннего выявления диабетического повреждения почек. На основании результатов данного исследования и предыдущих публикаций о гликированном альбумине исследователи допускают, что увеличение уровня NAG в моче может быть связано с колебаниями глюкозы в плазме и снижением секреции инсулина у пациентов с СД2.

3. NAG и поликистоз почек

Поликистоз почек — наследственное заболевание, которое характеризуется беспорядочным образованием множества кист в почках (рис. 6).

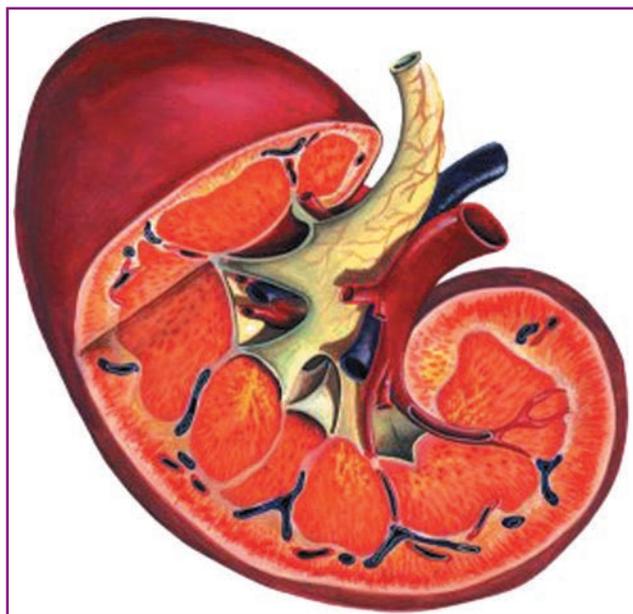


Рисунок 7. Преэклампсия может дать осложнения на почки (канальцевый некроз, некроз коркового вещества)

Киста представляет собой незлокачественные круглые мешочки, которые содержат в себе водянистую жидкость. При этом почки становятся большими, однако в них уменьшено количество нормально функционирующей ткани. Фактором развития поликистоза почек является наследственный фактор.

Давно признано, что измерение креатинина сыворотки или клиренс креатинина не являются чувствительным инструментом для диагностики поликистоза почек. Тем не менее врачи обычно используют креатинин сыворотки, вероятно из-за низкой стоимости исследования, для мониторинга развития заболевания. Ошибка такого подхода заключается в том, что к тому времени, когда обнаружен повышенный уровень креатинина сыворотки, объем почек уже существенно увеличен и кисты почек уничтожили большую часть почечной паренхимы [49]. При этом креатинин сыворотки в качестве лабораторного показателя при заболевании поликистозом почки означает, что потенциально терапевтические агенты, которые являются эффективными для ингибирования роста кисты, могут не оказать никаких клинических преимуществ. В настоящее время для скрининга данного заболевания рекомендуется использовать магнитно-резонансную терапию [50].

Одним из биомаркеров, который может применяться для мониторинга заболевания поликистозом почек, может служить измерение активности NAG. Так, в работе Н. Park и др. [51] было показано, что показатель NAG/креатинин может представлять собой полезный и функциональный маркер у больных с поликистозом почек. Действительно, показатель NAG в моче имеет ряд преимуществ при использовании его как нового биомаркера. Во-первых, активность NAG является достаточно стабильной, с небольшой суточной вариацией. Во-вторых, фермент является очень чувствительным к тубулярному повреждению. Даже незначительные изменения эпителиальных клеток щеточной каемки проксимальных канальцев приводят к экскреции NAG в моче, а повышение активности фермента прямо коррелирует с тубулярным повреждением. В-третьих, уровень NAG можно легко определить с помощью спектрофотометрического анализа. Исследователи отмечают, что при проведении иммуногистохимического анализа окрашивание было наиболее сильным вдоль внутренней части кисты и проксимальных канальцев эпителиальных клеток. Так, клетки, которые были зажаты с помощью соседних кист, имели более сильное окрашивание по сравнению с контрольными нормальными клетками. На основании этого предполагают, что ишемия, вызванная ростом кист в смежной ткани, может быть ключевым фактором в продуцировании NAG, а увеличение ее активности является объяснением высвобождения NAG из ближайших сжатых канальцев.

4. NAG при преэклампсии у беременных

Под термином «преэклампсия беременности» понимают все патологические состояния, которые возникают только во время беременности, приводят к осложнениям беременности и со стороны матери, и со стороны плода, чаще всего прекращаются после беременности и иногда переходят в экстрагенитальную патологию. Преэклампсия встречается у 6–8 % беременных в развитых странах и превышает 20 % в развивающихся. Основными ошибками при ведении беременности и родов, ведущими к тяжелым осложнениям для матери и плода, являются: несвоевременное выявление преэклампсии в амбулаторных условиях, поздняя госпитализация беременных, недооценка степени тяжести преэклампсии в условиях стационара, неадекватная терапия, необоснованное пролонгирование беременности при отсутствии положительного эффекта от лечения, нерациональное родоразрешение. На сегодняшний день преэклампсия остается одним из самых тяжелых осложнений беременности. Последствия преэклампсии могут касаться почек (рис. 7).

Во время беременности проводилось изучение изменения уровней активности NAG. Было установлено, что при нормально протекающей беременности уровень NAG в моче повышается в 3–4 раза по сравнению с нормальным в 3-м триместре. Однако у женщин с преэклампсией он повышается в десятки раз независимо от триместра и не снижается до нормального уровня через 6–18 месяцев после родов, как у женщин с беременностью без осложнений [52]. Многочисленные данные, полученные за последние годы, позволяют позиционировать NAG как потенциальный маркер преэклампсии у беременных или раннего тубулярного повреждения почек [53, 54].

5. NAG и другие заболевания почек

С. Vazzi [55] и другие ученые обследовали 136 пациентов с первичным гломерулонефритом (74 пациента с идиопатической мембранозной нефропатией, 44 — с первичным фокальным сегментарным гломерулосклерозом и 18 — с болезнью минимальных изменений). Было обнаружено, что экскреция NAG в моче может рассматриваться как надежный маркер тубулотоксичной протеинурии на ранних стадиях этих заболеваний. L. Orfeas и др. [56] обнаружили, что пациенты, имеющие повышенную активность NAG в моче, имели значительно более высокую распространенность сепсиса, олигурии и фракционную экскрецию натрия по сравнению с теми, кто имел низкие значения NAG.

Современные методы определения N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы

До недавнего времени определение активности NAG было сложным процессом, так как для этого требовались длительные и трудоемкие методики.

Однако в связи с разработкой и, в конечном итоге, производством коммерческих наборов это стало возможным осуществлять в любой клинико-диагностической лаборатории при наличии биохимического анализатора или иммуноферментного ридера для считывания плашек. В настоящее время для определения активности NAG в моче используют биохимические (колориметрические) или иммуноферментные (ELISA — ферментсвязанный иммуносорбентный метод) методы исследования.

Для колориметрических методов определения NAG применяются различные субстраты, такие как 2-метокси-4-(2-нитровинил)-фенил-2-ацетамид-2-деокси-β-D-глюкопиранозид, p-нитрофенил N-ацетил-β-D-глюкозаминида, 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида, 3-крезолсульфофталиенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминид.

Компании-производители наборов для определения NAG:

1. Diazyme (США) — колориметрический метод.
2. Roche Diagnostics (США) — колориметрический метод.
3. GenWay Biotech Inc. (США) — колориметрический метод.
4. Praill Price Richardson Diagnostics Ltd (Великобритания) — колориметрический метод.
5. Leadman (КНР) — колориметрический метод.
6. USCN Life Science (КНР) — метод ELISA.
7. Cusabio (США) — метод ELISA.

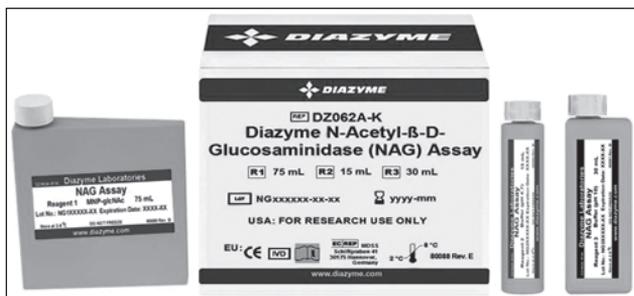


Рисунок 8. Набор для определения NAG компании Diazyme (США)

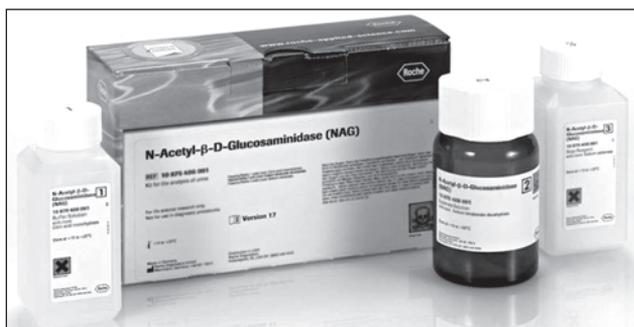


Рисунок 9. Набор для определения NAG компании Roche Diagnostics (Германия)

Определение NAG колориметрическим методом (биохимический анализ)

1. Набор компании Diazyme (США) для определения NAG

Принцип метода

NAG гидролизует 2-метокси-4-(2-нитровинил)-фенил-2-ацетамид-2-деокси-β-D-глюкопиранозид (MNP-GlcNAc) до 2-метокси-4-(2'-нитровинил)-фенола. Образующийся продукт реакции измеряется при длине волны 505 нм. Линейность NAG — до 200 Ед/л (рис. 8).

2. Набор компании Roche Diagnostics (Германия) для определения NAG

Принцип метода

5 мкл образца мочи инкубируется с 100 мкл раствора субстрата 3-крезолсульфофталиенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида в течение 20 мин при 37 °С (рис. 9). Реакция останавливается добавлением раствора, содержащего карбонат натрия. Оптическая плотность измеряется при длине волны 580 нм. Единицы измерения — Ед/л.

3. Набор компании PPR Diagnostics Ltd (Великобритания) для определения NAG

Ферментативная активность NAG определяется с использованием субстрата 2-метокси-4-(2-нитровинил)-фенил-2-ацетамид-2-деокси-β-D-глюкопиранозид (MNP-GlcNAc) (рис. 10).

Принцип метода

2-метокси-4-(2-нитровинил)-фенил-2-ацетамид-2-деокси-β-D-глюкопиранозид (MNP-Glc-NAc) гидролизует N-ацетил-β-D-глюкозаминидазой с высвобождением 2-метокси-4-(2-нитровинил)-фенола, который при добавлении щелочного буфера изменяет цвет. Измерение при длине волны 505 нм (рис. 11).

Определение NAG методом ELISA (иммуноанализ)

1. Набор компании Cusabio (США) для определения NAG

Принцип метода

Используется конкурентное ингибирование фермента с применением метода иммуноанализа.



Рисунок 10. Набор для определения NAG компании Praill Price Richardson Diagnostics Ltd (Великобритания)

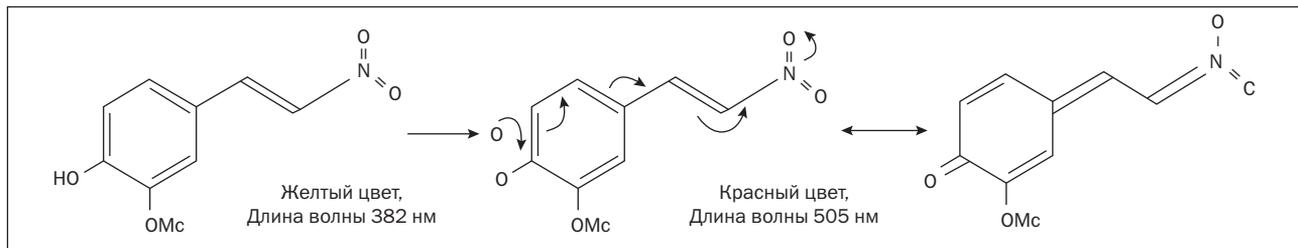


Рисунок 11. Принцип изменения цвета при измерении активности NAG

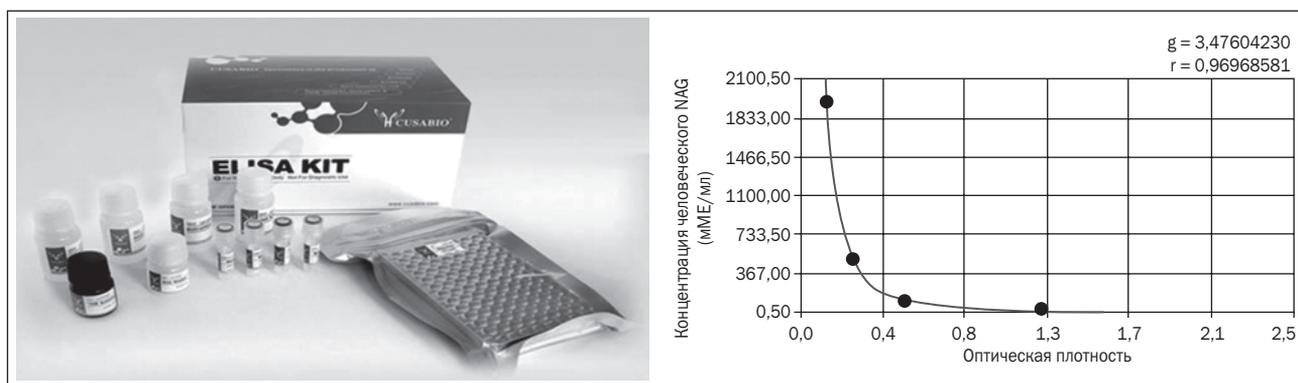


Рисунок 12. Набор для определения NAG компании Cusabio методом ELISA и пример калибровочного графика (оптическая плотность и концентрация NAG)

При этом антитела, специфичные к NAG, предварительно нанесены в лунки микропланшета. Образцы мочи и стандарты добавляют в лунки с пероксидазой хрена (HRP), конъюгированной NAG. Реакция конкурентного ингибирования запускается между NAG (образцом или стандартом) и HRP-конъюгированным NAG с предварительно покрытыми антителами, специфичными для NAG. Чем больше количество NAG в образце, тем меньше антител связываются с HRP-конъюгированным NAG. После промывки удаляется несвязанный реагент, добавляется раствор субстрата в лунки, и происходит окрашивание, которое обратно пропорционально количеству NAG в образце, т.е. работает принцип «меньше — значит больше» (чем меньше сигнал, тем больше концентрация NAG). Развитие окраски останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют интенсивность окрашивания с помощью ридера (рис. 12). Пределы измерения — 5–2000 мМЕ/мл.

Важно помнить, что в зависимости от используемого набора для определения NAG ее активность может быть выражена в таких единицах, как ЕД/л, МЕ/л, мМЕ/мл, ЕД/ммоль, нг/мл. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой собственный референтный интервал.

Таким образом, определение активности NAG как раннего биомаркера повреждения почек является особенно актуальным для практической медицины, так как:

— дает возможность проводить доклиническую диагностику диабетической нефропатии и назначать терапию с последующим замедлением прогрессирования патологического процесса почек;

— осуществлять мониторинг таких заболеваний, как нефротический синдром, гломерулонефрит, преэклампсия, инфекции мочевыводящих путей;

— проводить быструю диагностику острого повреждения почек в условиях военных действий, чрезвычайных ситуациях, когда необходимо принять быстрое решение;

— служит индикатором нефротоксичности при действии определенных лекарственных средств и химических агентов.

Конфликт интересов: не заявлен.

Список литературы

1. Kolesnikov S.V., Borisov A.S. *Biomarkery ostrogo pochechnogo povrejdeniya: klinicheskii aspekt // Nephrologia i dialys. — 2013. — T. 15, № 3. — С. 184-190.*
2. Devarajan P. *Biomarkers for the Early Detection of Acute Kidney Injury // Curr. Opin. Pediatr. — 2011 April. — Vol. 23(2). — P. 194-200.*
3. Geus H., Betjes M., Bakker J. *Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges // Clin. Kidney J. — 2012. — Vol. 5. — № 2. — P. 102-108.*
4. Bosomworth M.P., Aparicio S.R., Hay A.W. *Urine N-acetyl-β-D glucosaminidase — a marker of tubular damage? // Nephrol. Dial. Transplant. — 1999. — 620-626.*
5. Skálová S. *The diagnostic role of urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment // S. Skálová // Acta Medica. — 2005. — Vol. 48. — P. 75-80.*
6. Liangos O., Perianayagan M.C., Vaidya V.S. *et al. Urinary N-acetyl-beta-(D) — glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adheres outcomes in acute renal failure // J. Am. Soc. Nephrol. — 2007. — 18(3). — 904-912.*
7. Mohkam M. *The Role of Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in Diagnosis of Kidney Diseases // M. Mohkam, A. Ghafari // J. Ped. Nephrology. — 2015. — Vol. 3. — P. 84-91.*

8. Assay of Urinary N-Acetyl- β -glucosaminidase in a Centrifugal Analyzer Powell / C. Samuel, J. Scaro, E. Wilson, Z.K. Shihabi // *Clin. Chem.* — 1983. — Vol. 29. — P. 1717-1719.
9. Li J., Li Q.X., Xie X.F. et al. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats // *Eur. J. Pharmacol.* — 2009. — 620. — 97-104.
10. Xu Z., Yang J., Yu J. et al. Effects of BSO, GSH, Vit-C and DMPS on the nephrotoxicity of mercury // *Toxicol. Ind. Health.* — 2007. — 23. — 403-410.
11. Ali B.H., Al Moundhri M.S., Tag Eldin M. et al. The ameliorative effect of cysteine prodrug L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats // *Fundam. Clin. Pharmacol.* — 2007. — 21. — 547-553.
12. Westhuyzen J., Endre Z.H., Reece G. et al. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2003. — 18. — 543-551.
13. Bondiou M.T., Bourbouze R., Bernard M. et al. Inhibition of A and B N-acetyl-beta-D-glucosaminidase urinary isoenzymes by urea // *Clin. Chim. Acta.* — 1985. — 149. — 67-73.
14. Vaidya V.S., Ramirez V., Ichimura T. et al. Urinary kidney injury molecule-1 (Kim-1): a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2005.
15. Price R. The role of NAG (N-acetyl-beta-d-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity // *Clin. Nephrol.* — 1992. — Vol. 38. — P. 14-19.
16. Zheng J., Xiao Y., Yao Y. et al. Comparison of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass surgery in infants and young children // *Pediatr. Cardiol.* — 2013. — Vol. 34, № 4. — P. 880-886.
17. Damman K., Masson S., Hillege H.L. et al. Tubular damage and worsening renal function in chronic heart failure // *JACC Heart Fail.* — 2013. — Vol. 1, № 5. — P. 417-424.
18. Marchewka Z., Kuzniar J., Dlugosz A. Enzymuria and beta-2-microglobulinuria in the assessment of the influence of proteinuria on the progression of glomerulopathies // *Int. Urol. Nephrol.* — 2001. — Vol. 33. — P. 673-676.
19. Mogensen C.E., Christensen C.K. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients // *N. Engl. J. Med.* — 1984. — 311(2). — 89-93.
20. Mogensen C.E. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes // *N. Engl. J. Med.* — 1984. — 310(6). — 356-360.
21. Rocco M.V., Berns J.S. KDOQI in the era of global guidelines // *Am. J. Kidney Dis.* — 2009. — 54(5). — 781-787.
22. Vaidya V.S. et al. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase // *Kidney Int.* — 2011. — 79(4). — 464-470.
23. Mottl A.K., Kwon K.S., Mauer M., Mayer-Davis E.J., Hogan S.L., Kshirsagar A.V. Normoalbuminuric diabetic kidney disease in the U.S. population // *J. Diabetes Complications.* — 2013. — 27(2). — 123-127.
24. Perkins B.A., Ficociello L.H., Silva K.H., Finkelstein D.M., Warram J.H., Krolewski A.S. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — 348(23). — 2285-2293.
25. Шестакова М.В. Современное понятие «хроническая болезнь почек»: методы диагностики, клиническое значение // *Сахарный диабет.* — 2008. — 2. — 4-7.
26. Pedersen M.M., Christiansen J.S., Pedersen E.B., Mogensen C.E. Determinants of intraindividual variation in kidney function in normoalbuminuric insulin-dependent diabetic patients: importance of atrial natriuretic peptide and glycaemic control // *Clin. Sci.* — 1992. — 83. — 445-51.
27. Kania K., Byrnes E.A., Beilby J.P., Webb S.A., Strong K.J. Urinary proteases degrade albumin: implications for measurement of albuminuria in stored samples // *Ann. Clin. Biochem.* — 2010. — 47(Pt 2). — 151-7.
28. Dedov I.I., Shestakov M.V. Saharniy diabet i chronicheskaya bolezнь почек. — M.: Meditsinskoye informatsionnoe agentstvo, 2009. — 482 c.
29. Nauta F.L., Boertien W.E., Bakker S.J., van Goor H., van Oeveren W., de Jong P.E., Bilo H., Gansevoort R.T. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes // *Diabetes Care.* — 2011 Apr. — 34(4). — 975-981. [Epub 2011 Feb 9]
30. Vaidya V.S., Niewczas M.A., Ficociello L.H., Johnson A.C., Collings F.B., Warram J.H., Krolewski A.S., Bonventre J.V. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase // *Kidney Int.* — 2011 Feb. — 79(4). — 464-470. [Epub 2010 Oct 27]
31. Kern E.F., Erhard P., Sun W., Genuth S., Weiss M.F. Early Urinary Markers of Diabetic Kidney Disease: A Nested Case-Control Study From the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) // *Am. J. Kidney Dis.* — 2010 May. — 55(5). — 824-834.
32. Mohammadi-Karakani A., Asgharzadeh-Haghighi S., Ghazi-Khansari M., Hosseini R. Determination of urinary enzymes as a marker of early renal damage in diabetic patients // *J. Clin. Lab. Anal.* — 2007. — 21(6). — 413-417.
33. Sheira G., Noreldin N., Tamer A., Saad M. Urinary biomarker N-acetyl- β -D-glucosaminidase can predict severity of renal damage in diabetic nephropathy // *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders.* — 12 February 2015. — 14. — 4.
34. Kaneko K., Chiba M., Hashizume M., Kunii O., Sasaki S., Shimoda T. et al. Renal tubular dysfunction in children living in the Aral Sea Region // *Arch. Dis. Child.* — 2003. — 88. — 966-8.
35. Abdel Shakour S., Hefnawy H., Yamani M., Azmi Y. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in children with diabetes as an early marker of diabetic nephropathy // *East Mediterr. Health J.* — 2002. — 8. — 24-30.
36. Kuźniar J., Marchewka Z., Lembas-Bogaczyk J., Kuźniar T.J., Klinger M. Etiology of increased enzymuria in different morphological forms of glomerulonephritis // *Nephron. Physiol.* — 2004. — 98. — 8-14.
37. Navarro J.F., Mora C., Muros M., Maca M., Garca J. Effects of pentoxifylline administration on urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion in type 2 diabetic patients: a short-term, prospective, randomized study // *Am. J. Kidney Dis.* — 2003. — 422. — 264-70.
38. Nauta F., Bakker S., Oeveren W., Navis G., van der Heide J.J., van Goor H. et al. Albuminuria, proteinuria, and novel urine biomarkers as predictors of long-term allograft outcomes in kidney transplant recipients // *Am. J. Kidney Dis.* — 2011. — 57. — 733-43.
39. Bouvet B.R., Paparella C.V., Arriaga S., Monje A.L., Amarilla A.M., Adriana M. Almará A. Evaluation of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase as a marker of early renal damage in patients with type 2 diabetes mellitus // *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* — 2014. — 58/8. — 798-801.
40. Nauta F.L., Boertien W.E., Bakker S.J., van Goor H., van Oeveren W., de Jong P.E. et al. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes // *Diabetes Care.* — 2011. — 34. — 975-81.
41. Piwowar A., Knapik-Kordecka M., Fus I., Warwas M. Urinary activities of cathepsin B, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus // *Med. Sci. Monit.* — 2006. — 12. — CR210-14.
42. Udomah F.P., Ekpenyong Ekrikpo U., Effa E., Salako B., Arije A., Kadiri S. Association between Urinary N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase and Microalbuminuria in Diabetic Black Africans // *Int. J. Nephrol.* — 2012. — 235234.
43. Kim S.R., Lee Yong-ho, Lee Sang-Guk, Eun Seok Kang, Bong-Soo Cha, Kim Jeong-Ho, Lee Byung-Wan. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase, an early marker of diabetic kidney disease, might reflect glucose excursion in patients with type 2 diabetes // *Medicine.* — 2016. — 95. — 27. — P. 1-8.
44. Fu W.J., Xiong S.L., Fang Y.G. et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study // *Endocrine.* — 2012. — 41. — 82-8.

45. Nauta F.L., Boertien W.E., Bakker S.J. et al. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes // *Diabetes Care*. — 2011. — 34. — 975-81.
46. Patel D.N., Kalia K. Efficacy of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase to evaluate early renal tubular damage as a consequence of type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study // *Int. J. Diabetes Developing Countries*. — 2015. — 35. — 449-57.
47. Sheira G., Noreldin N., Tamer A. et al. Urinary biomarker N-acetyl-beta-D-glucosaminidase can predict severity of renal damage in diabetic nephropathy // *J. Diabetes Metab. Disord.* — 2015. — 14. — 4.
48. Tanaka A., Shima K., Fukuda M. et al. Tubular dysfunction in the early stage of diabetic nephropathy // *Med. J. Osaka Univ.* — 1989. — 38. — 57-63.
49. Grantham J.J., Torres V.E., Chapman A.B., Guay-Woodford L.M., Bae K.T., King B.F. Jr, Wetzel L.H., Baumgarten D.A., Kenney P.J., Harris P.C., Klahr S., Bennett W.M., Hirschman G.N., Meyers C.M., Zhang X., Zhu F., Miller J.P., CRISP Investigators: Volume progression in polycystic kidney disease // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — 354. — 2122-2130.
50. Serra A.L., Kistler A.D., Poster D., Strucker M., Wuthrich R.P., Weishaupt D., Tschirch F. Clinical proof-of-concept trial to assess the therapeutic effect of sirolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: SUISE ADPKD study // *BMC Nephrol.* — 2007. — 8. — 13.
51. Park H.C., Hwang J.H., Kang Ah-Young et al. Urinary N-acetyl- β -D glucosaminidase as a surrogate marker for renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease: 1 year prospective cohort study? // *BMC Nephrology*. — 2012. — 13. — 93.
52. Hultberg B., Isaksson A., Krutzen E., Nilsson-Ehle P. Urinary Excretion of N-Acetyl- β -D-glucosaminidase in Normal and Complicated Pregnancy // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1989. — Vol. 27. — P. 487-489.
53. Semczuk-Sikora A., Sikora P., Semczuk M., Biadun U. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) excretion in women with pregnancy complicated with hypertension // *Ginekol. Pol.* — 2003. — Vol. 74. — P. 1269-1275.
54. Jacob M., Wilfred G., Kanagasabapathy A.S., Balasubramanian N. Urinary N-Acetyl- β -D-glucosaminidase in the Prediction of Preeclampsia and Pregnancy-induced Hypertension // *ANZJOG.* — 2008. — Vol. 10. — P. 28-31.
55. Bazzi C., Petrini C., Rizza V., Arrigo G., Napodano P., Paparella M. et al. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2002. — 17. — 1890-6.
56. Orfeas L., Mary C., Vishal S. et al. (Urinary N-Acetyl-(D)-Glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2007. — 18. — 904-12.

Получено 07.09.16 ■

Мельник О.О.
Спеціалізований медичний центр «Оптима-Фарм», м. Київ, Україна

ДІАГНОСТИЧНА РОЛЬ N-АЦЕТИЛ- β -D-ГЛЮКОЗАМІНІДАЗИ ЯК РАНЬОГО МАРКЕРА ПОШКОДЖЕННЯ НИРОК

Резюме. При багатьох захворюваннях нирок N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза (NAG) екскретується в сечі у великих кількостях. Значне збільшення активності NAG відзначено при первинному та вторинному пошкодженні нирок, отруєнні тяжкими металами, трансплантації нирок, пухлині нирок, гіпертензії, преєклампсії у вагітних, діабетичній нефропатії, полікістозі, гломерулонефриті. Розроблено комерційні наборо-

ри для вимірювання активності NAG із використанням колориметричного (біохімічного) та імуноферментного (ELISA) методів дослідження.

Ключові слова: підвищення активності N-ацетил- β -D-глюкозамінідази (NAG) у сечі, діабетична нефропатія, полікістоз, преєклампсія у вагітних, гломерулонефрит, колориметричний і імуноферментний методи визначення активності NAG у сечі.

Melnyk O.O.
Specialized Medical Center «Optima-Pharm», Kyiv, Ukraine

DIAGNOSTIC ROLE OF N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE AS AN EARLY MARKER OF KIDNEY DAMAGE

Summary. In many diseases of the kidneys, N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in the urine is excreted in large quantities. A significant increase in NAG activity is observed at the primary and secondary kidney damage, heavy metal poisoning, kidney transplantation, kidney tumor, hypertension, preeclampsia in pregnant women, diabetic nephropathy, polycystic kidneys, glomerulonephritis. Commercial kits have been developed to

measure the activity of NAG using a colorimetric (biochemical) and enzyme-linked immunosorbent (ELISA) methods of research.

Key words: increased activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in the urine, diabetic nephropathy, polycystic kidneys, preeclampsia in pregnant women, glomerulonephritis, colorimetric and enzyme immunoassay methods for determining urinary NAG.