

Обмен гликозаминогликанов и активность лизосомальных ферментов у больных с диабетической нефропатией

И.А. Бондарь¹, В.В. Климонтов¹,
Г.А. Пауль², А.Б. Пупышев¹, С.М. Амбросова²

Новосибирская государственная медицинская академия¹,
Новосибирский государственный областной
клинический диагностический центр²

Диабетическая нефропатия (ДН) является ведущей причиной смерти больных сахарным диабетом (СД) типа 1 и третьей по частоте (после сердечно-сосудистых осложнений и опухолей) у больных СД типа 2 [4]. Доказано, что ведущая роль в формировании ДН принадлежит гипергликемии и связанными с ней метаболическими нарушениями [2]. Среди последних особое внимание привлекают изменения обмена протеогликанов – комплексных соединений гликозаминогликанов (ГАГ) и белков. Протеогликаны являются важнейшими биохимическими компонентами мезангия клубочков, базальных мембран и сосудистой стенки; их функциональная роль состоит в обеспечении нормальной структуры и проницаемости почечного фильтра, создании отрицательного заряда эндотелия, регуляции роста гладкомышечных клеток сосудов [14].

При СД нарушен синтез ГАГ в клубочках почек [10, 27], изменен нормальный состав ГАГ и протеогликанов в базальных мембранах и сосудистой стенке [11, 16, 25]. Механизмы развития этих изменений и их взаимосвязь с развитием нефропатии окончательно не ясны. Данные, полученные на культурах клубочковых клеток, позволяют предполагать, что причиной изменений экспрессии протеогликанов при СД являются гипергликемия [17] и накопление поздних продуктов гликации [5]. Не изучена роль ферментов, осуществляющих катаболизм протеогликанов – лизосомальных протеаз и гликозидаз при СД.

В данной работе мы исследовали обмен протеогликанов у больных СД типа 1 с разными стадиями нефропатии, используя косвенный неинвазивный метод, основанный на определении количества и фракционного состава сульфатированных ГАГ, экскретируемых с мочой. Цель работы состояла в изучении взаимосвязи экскреции ГАГ с качеством гликемического контроля, стадией ДН и активностью вовлеченных в катаболизм протеогликанов лизосомальных ферментов.

Объем и методы исследования

Обследовано 46 больных СД 1 типа, 25 мужчин и 21 женщина в возрасте от 16 до 50 лет ($30,3 \pm 1,7$ г), с длительностью заболевания от 2 мес до 28 лет ($9,4 \pm 1,4$ года). В состоянии декомпенсации углеводного обмена находились 40 человек. Больные, получали ГАГ-содержащие (гепарины, сулодексид), антиоксидантные и лизосомотропные препараты.

В зависимости от наличия и выраженности ДН больные распределены на 3 группы: в 1-ю вошли больные с нормальной экскрецией белка с мочой, во 2-ю – пациенты с микроальбуминурией или протеинурией до 0,3 г/сут, в 3-ю – больные с клинически выраженной ДН (табл. 1). Контрольную группу составили 25 здоровых лиц (13 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 15 до 50 лет.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика больных ($M \pm m$)

Показатель	Группы больных		
	1-я (n=14)	2-я (n=20)	3-я (n=12)
Пол, мужчины/женщины	8/6	9/11	8/4
Возраст, годы	30,7+4,4	32,4+2,2	30,7+3,2
Длительность СД, годы	7,1+3,3	8,9+1,6	15,1+2,2**
HbA _{1c} , %	11,3+1,2	11,8+0,7	11,7+1,2
Гликемия среднесуточная, ммоль/л	9,6+0,7	10,3+0,6	11,1+0,8
Креатинин крови, мкмоль/л	68,7+2,5	64,6+2,8	88,8+9,4*,**
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	117,5+9,8	115,2+5,7	100,1+9,3
Антиген фактора Виллебранда в плазме крови, %	109,3+5,9	133,4+3,3*	137,7+6,2*

Примечание: звездочки – достоверные ($p < 0,05$) различия: одна – с 1-й группой больных, две – со 2-й.

Комплекс обследования включал определение гликемии глюкоксидазным методом, HbA_{1c} хроматографическим методом с помощью наборов «Диабет-Тест» АО «Фосфосорб» (Россия)¹; клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции по клиренсу эн-

Диапазон нормальных показателей при определении данным методом 4,2-8%

догенного креатинина, протеинурии с сульфосалициловой кислотой (трехкратно). У больных без явной протеинурии исследовали альбуминурию иммунохимическим полуколичественным методом с помощью тест-полосок «Микраль-Тест-11» фирмы «Boehringer Mannheim» (Австрия). Для верификации повреждения сосудистого эндотелия определяли концентрацию антигена фактора Виллебранда в плазме венозной крови ELISA-методом с использованием наборов «ASSERACHROM vWF» той же фирмы.

Экскрецию суммарных сульфатированных ГАГ определяли в утренней порции мочи с помощью раствора алцианового синего 8 GX по методу E. W. Gold. (1981) в разработанной нами модификации [3]. Результат приводили к величине экскретируемого креатинина и выражали в мг ГАГ на 1 ммоль креатинина. Фракционный состав ГАГ исследовали методом электрофоретического разделения на ацетат-целлюлозных мембранах в 0,1 М барий-ацетатном буфере (рН=4,8) по С. А. Реппock. (1976). У 12 человек исследование уровня ГАГ проводили дважды.

Определение активности лизосомальных ферментов: N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы и β-галактозидазы в сыворотке крови проводили спектрофотометрическим методом по Barret A. L. (1972). В качестве субстратов использовали 4-нитрофенил-β-D-глюкозаминид и 4-нитрофенил-β-D-галактопиранозид соответственно.

Статистическая обработка проведена с использованием стандартных методов вариационной статистики с помощью пакета анализа Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента (с поправкой Бонферрони для множественных сравнений).

Результаты и их обсуждение

Исследование показало, что у больных СД в сравнении с контролем в среднем в 2,5 раза увеличена суммарная экскреция сульфатированных ГАГ с мочой ($5,90 \pm 0,38$ и $2,32 \pm 0,19$ мг/ммоль креатинина соответственно, $p < 0,001$). Этот показатель в 87% случаев превышал верхнюю границу доверительного интервала в контроле (1,39–3,25 мг/ммоль). Отмечена тенденция к возрастанию экскреции ГАГ по мере увеличения выраженности нефропатии. Наибольшие значения зафиксированы у больных с клинически явной ДН (рис. 1), что согласуется с другими данными [15, 18]. Обнаружена слабая корреляция между показателями экскреции ГАГ, уровнем гликогемиоглобина ($r=0,34$, $p < 0,05$) и среднесуточной гликемией ($r=0,31$, $p < 0,05$). Исследование содержания ГАГ, проведенное с трехнедельным интервалом, показало, что краткосрочное улучшение компенсации углеводного обмена сопровождалось некоторым снижением ГАГ-урии, однако различия показателей не достигли статистической значимости ($p > 0,05$).

Известно, что ГАГ – гетерогенная группа веществ, различающихся по структуре, локализации и функциям. В почках присутствуют 3 вида сульфатированных ГАГ: гепарансульфат, хондроитинсульфат и дерматансульфат. Гепарансульфат является одним из основных компонентов гломерулярной базальной мембраны, а хондроитинсульфат и дерматансульфат локализованы в мезангиальном матриксе. Синтез ГАГ и протеогликанов в почечном клубочке осуществляют эпителиальные и мезангиальные клетки [21, 22].

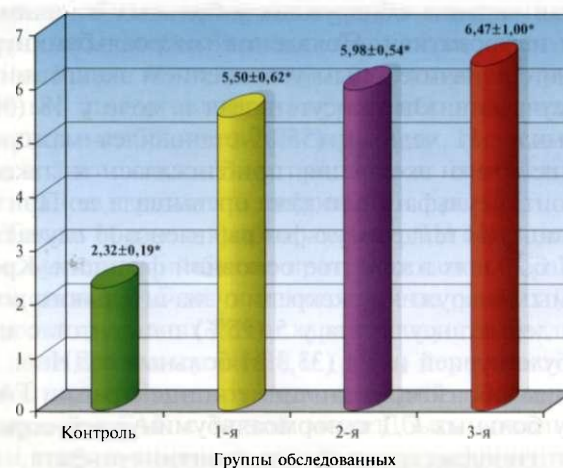


Рис. 1. Экскреция с мочой сульфатированных ГАГ (мг/ммоль креатинина) у больных СД 1 типа с различными стадиями ДН.

* – достоверное ($p < 0,001$) различие с контролем; различия между группами больных недостоверны ($p > 0,05$).

Для ответа на вопрос, какой вид ГАГ вносит наибольший вклад в увеличение их суммарной экскреции при СД, нами изучен фракционный состав ГАГ мочи у больных и лиц контрольной группы. У здоровых лиц основным компонентом ГАГ являлся хондроитинсульфат (рис. 2). У 6 из 25 лиц контрольной группы (24%) присутствовал также гепарансульфат в качестве минорной фракции. Дерматансульфат и кератансульфат не выявлены ни в одном случае, что, очевидно, объясняется их крайне низкой (ниже порога чувствительности метода) концентрацией в моче здоровых людей. Состав и соотношение фракций ГАГ у большинства пациентов с нормальной экскрецией белка с мочой существенно не менялись. Во всех случаях основным компонентом оставался хондроитинсульфат. Гепарансульфат присутствовал у 4 человек (28,6%), причем у 2 – в концентрации, близкой к концентрации хондроитинсульфата.

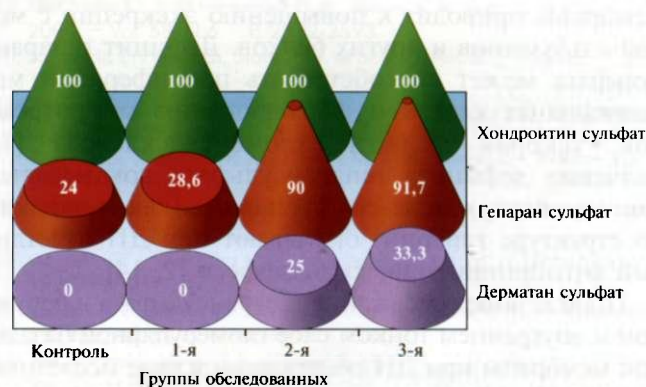


Рис. 2. Частота (%) выявления различных фракций ГАГ в моче у здоровых людей и у больных СД 1 типа с различными стадиями ДН.

Иная картина обнаружена у больных с начинающейся нефропатией. Появление микроальбуминурии связано со значительным увеличением экскреции гепарансульфата. Он присутствовал в моче у 18 (90%) больных, у 11 человек (55%) становился мажорной фракцией, его экскреция приближалась к таковой хондроитинсульфата или даже превышала ее. При выраженной ДН гепарансульфат выявлен в 11 случаях из 12, у 7 больных в качестве основной фракции. Кроме того, мы обнаружили экскрецию значительного количества дерматансульфата у 5 (25%) пациентов с микроальбуминурией и у 4 (33,3%) больных с ДН.

Таким образом, увеличение концентрации ГАГ в моче у больных СД с нормоальбуминурией определяется гиперэкскрецией хондроитинсульфата, а у пациентов с микро- и макроальбуминурией — других видов ГАГ: гепарансульфата и реже дерматансульфата. Это согласуется с данными об изменении содержания этих ГАГ в различных структурах почек при СД. Индукция СД приводит к накоплению в почках животных хондроитин- и дерматансульфата [6]. Хондроитинсульфат-содержащие протеогликаны откладываются в субэндотелии в зонах утолщения базальной мембраны и повреждения эндотелиальной выстилки клубочковых капилляров [19]. Встраивание хондроитинсульфата в состав базальной мембраны клубочков обнаружено у больных с ДН [9]. Предполагается их роль в развитии протеинурии и гломерулосклероза.

Как свидетельствуют наши данные, у больных СД с микро- и макроальбуминурией наибольшие изменения претерпевает экскреция гепарансульфата, повышенная концентрация его в моче закономерно обнаруживается при поражениях почек, протекающих с протеинурией [13, 20]. Известно, что гепарансульфат-содержащие протеогликаны являются основным полианионным компонентом базальной мембраны клубочков, который определяет ее отрицательный заряд и препятствует прохождению через почечный фильтр отрицательно заряженных молекул, в том числе альбумина. Поэтому снижение содержания гепарансульфата в составе гломерулярной мембраны приводит к повышению экскреции с мочой альбуминов и других белков. Дефицит гепарансульфата может способствовать пролиферации мезангиальных клеток и формированию микротромбов, ускоряя развитие гломерулосклероза [7]. Значение дефицита гепарансульфата доказывается тем, что содержащие его препараты (как и близкий по структуре гепарин) оказывают при ДН отчетливый антипротеинурический эффект [2, 14].

Пониженное содержание гепарансульфата в наружном и внутреннем тонком слое гломерулярной базальной мембраны при ДН обнаружено в ряде исследований [8, 23, 25]. Интересно, что количество гепарансульфата редуцировано не только в базальной мембране клубочков, но и в базальных мембранах других органов [24, 26]. Причиной может быть снижение

интенсивности биосинтеза гепарансульфата, которое наблюдается при гипергликемии [17]. Возможно также, что при СД синтезируется аномальный гепарансульфат, измененные физико-химические свойства которого затрудняют взаимодействие с другими молекулами и встраивание в состав базальных мембран. О наличии качественных аномалий биосинтеза свидетельствуют структурные изменения полисахаридных цепей гепарансульфата в почках больных диабетом [8]. Возможно, что потеря гепарансульфата является следствием повышенного распада протеогликановых комплексов базальных мембран. В пользу последнего предположения свидетельствует обнаруженное нами высокое содержание гепарансульфата, а также других видов ГАГ в моче больных СД с нефропатией. Триггером катаболизма протеогликанов и других гликопротеидов может быть повышенный уровень лизосомальных ферментов в кровотоке при СД [28].

В данной работе была изучена сывороточная активность двух кислых лизосомальных гликозидаз: N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы и β-галактозидазы, вовлеченных в катаболизм ГАГ. Активность ферментов оказалась значительно выше у больных СД (в среднем в 1,8 и 1,7 раза; 1107 ± 62 и $1,61 \pm 0,12$ нмоль/мл/ч соот-

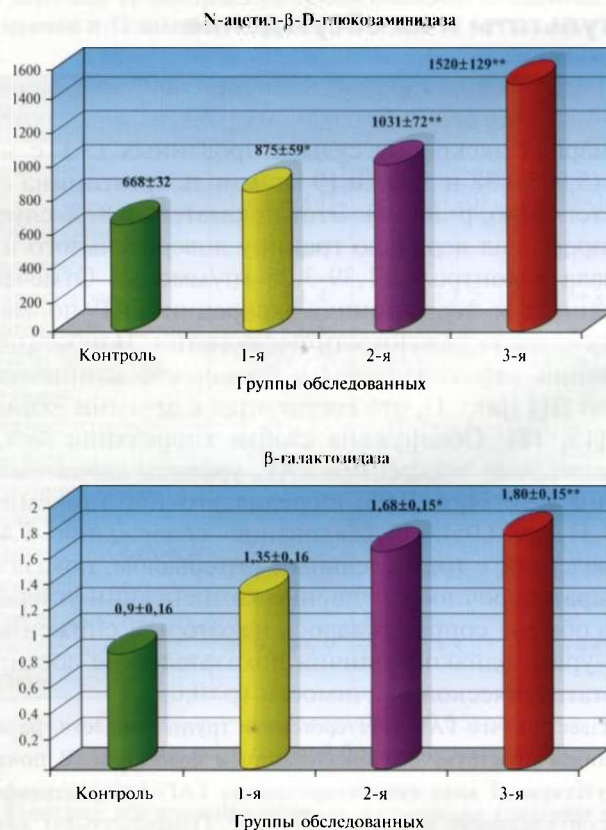


Рис. 3. Активность лизосомальных гликозидаз (нмоль/мл/ч) в сыворотке крови у больных СД 1 типа с различными стадиями ДН.

Звездочки - достоверное ($p < 0,05$) различие: одна — с контролем, две — с контролем и 1-й группой больных.

ветственно, $p < 0,01$). Ранее нами установлено, что при СД активность данных энзимов меняется разнонаправленно в сыворотке и лейкоцитах крови: повышается в сыворотке и снижается в клетках [1]. В связи с этим возрастание активности лизосомальных гликозидаз в кровотоке при СД можно объяснить частично лабильностью мембран лизосом и выходом ферментов в цитозоль и кровеносное русло. Как видно на рис. 3, активность энзимов возрастала по мере утяжеления нефропатии и была наибольшей у больных с клинически явной ДН. Взаимосвязь ферментемии с развитием ДН подтверждают положительные корреляции активности энзимов с суточной протеинурией и уровнем мочевины и негативные — со скоростью клубочковой фильтрации (табл. 2). Обнаружена прямая взаимосвязь между активностью ферментов и концентрацией в плазме крови антигена фактора Виллебранда — маркера эндотелиального повреждения, уровень которого был повышен у больных с начинающейся и явной нефропатией (см. табл. 1).

В определенных условиях лизосомальные ферменты способны проявлять литическую активность внеклеточно [12]; допустимо предположить, что лизосомальные гликозидазы, в избытке циркулирующие в крови при СД, могут включаться в катаболизм протеогликанов эндотелия и базальных мембран и являться «медиаторами» в развитии сосудистых осложнений, в частности, нефропатии. Косвенно в пользу этого предположения свидетельствуют положительные корреляции между показателями экскреции ГАГ и активностью N-ацетил- β -D-глюкозамидазы ($r=0,46$, $p < 0,05$) и β -галактозидазы ($r=0,41$, $p < 0,05$), обнаруженные нами у больных с ДН. Взаимосвязь обмена протеогликанов с изменениями активности катаболических ферментов заслуживает дальнейших исследований. С учетом полученных данных представляется перспективным изучение влияния мембраностабилизирующих, лизосомотропных и антиоксидантных препаратов на обмен протеогликанов и развитие нефропатии при СД.

Таким образом, формирование ДН сопровождается изменениями обмена протеогликанов. Фракционный состав ГАГ мочи изменяется на ранних (доклинических) стадиях ДН и характеризуется увеличением доли гепарансульфата и (реже) дерматансульфата в составе экскретируемых фракций. Исследование экскреции ГАГ с мочой может быть дополнительным тестом в ранней диагностике нефропатии. Полученные данные являются патогенетическим обоснованием для включения в комплекс лечения ДН препаратов ГАГ (сулодексид и гепарины).

Таблица 2

Корреляции сывороточной активности лизосомальных ферментов с другими биохимическими параметрами у больных СД

Показатель	N-ацетил- β -D-глюкозамидаза	β -галактозидаза
Протеинурия	0,45*	0,53*
Мочевина сыворотки	0,41*	0,3*
Скорость клубочковой фильтрации	-0,41*	-0,22
Антиген фактора Виллебранда	0,43*	0,53*
HbA1c	0,09	0,07
Гликемия среднесуточная	0,03	-0,08

Примечание: * — $p < 0,05$.

Литература

- Бондарь И. А., Пупышев А. Б., Климонтов В. В. // Пробл. эндокринол. — 2000. — № 5. — С. 3-6.
- Дедов И. И., Шестакова М. В. Диабетическая нефропатия. — М., 2000.
- Пауль Г. А., Русова Т. В. // Клин. лаб. диагностика. — 1995. — № 2. — С. 13-14.
- Шестакова М. В. // Материалы IV Всероссийского Конгресса эндокринологов. — С.-Пб., 2001. — С. 237.
- Borrebak J., Prydz K., Fjeldstad K. et al. // Diabetologia. — 2001. — Vol. 44, N 4. — P. 488-494.
- Cadaval R., Kohlman O., Michelacci Y. // Glycobiology. — 2000. — Vol. 10, N 2. — P. 185-192.
- Davies M., Kastner S., Thomas G. J. // Kidney Int. — 1996. — Vol. 49, Suppl. 54. — P. S55-S60.
- Edge A. S. B., Spiro R. G. // Diabetologia. — 2000. — Vol. 43, N 8. — P. 1056-1059.
- Goode N. P., Shires M., Crellin D. M. et al. // Diabetologia. — 1995. — Vol. 38, N 12. — P. 1455-1465.
- Hadad S. J., Michelacci Y. M., Schor N. // Biochim. Biophys. Acta. — 1996. — Vol. 21, N 1. — P. 18-28.
- Heickendorff L., Leden T., Rasmussen L. M. // Diabetologia. — 1994. — Vol. 37, N 3. — P. 286-292.
- Holtzman E. Lysosomes. — 2-d Ed. — New York, London, 1989.
- Jadresic L. P., Filler G., Barratt T. M. // Kidney Int. — 1991. — Vol. 40, N 2. — P. 280-284.
- Jensen T. // Diabetes. — 1997. — Vol. 46, Suppl. 2. — P. S98-S100.
- Kahaly G., Hansen C., Otto E. et al. // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. — 1997. — Vol. 105, N 3. — P. 145-151.
- Karasawa R., Nishi S., Suzuki Y. et al. // Nephron. — 1997. — Vol. 76, N 1. — P. 62-71.
- Kasinath B. S. // Arch. Biochem. Biophys. — 1995. — Vol. 318, N 2. — P. 286-294.
- McAuliffe A. V., Fisher E. J., McLennan S. V. et al. // Diabet. Med. — 1996. — Vol. 13, N 8. — P. 758-763.
- McCarthy K. J., Abrahamson D. R., Bynum K. R. et al. // Kidney Int. — 2000. — Vol. 58, N 6. — P. 2592-2593.
- Stefanidis I., Heintz B., Stocker G. et al. // J. Am. Soc. Nephrol. — 1996. — Vol. 7, N 12. — P. 2670-2676.
- Thomas G. J., Jenner L., Mason R. M., Davies M. // Arch. Biochem. Biophys. — 1990. — Vol. 278, N 1. — P. 11-20.
- Thomas G. J., Mason R. M., Davies M. // Biochem. J. — 1991. — Vol. 277, Pt. 1. — P. 81-88.
- van den Born J., van Kraats A. A., Bakker M. A. et al. // Diabetologia. — 1995. — Vol. 38, N 10. — P. 1169-1175.
- van der Pijl J. W., Daha M. R., van den Born J. et al. // Diabetologia. — 1998. — Vol. 41, N 7. — P. 791-798.
- Vernier R. L., Steffes M. W., Sisson-Ross S., Mauer S. M. // Kidney Int. — 1992. — Vol. 41, N 4. — P. 1070-1080.
- Yokoyama H., Hoyer P. E., Hansen P. M. et al. // Diabetes. — 1997. — Vol. 46, N 11. — P. 1875-1880.
- Yokoyama H., Sato K., Okudaira M. et al. // Kidney Int. — 1999. — Vol. 56, N 2. — P. 650-658.
- Waters P. J., Flynn M. D., Corall R. J. M., Pennock C. A. // Diabetologia. — 1992. — Vol. 35, N 10. — P. 991-995.