

# ROLUL ECHIPAMENTULUI ENZIMATIC URINAR ÎN DETECTAREA PRECOCE A INJURIEI RENALE LA PACIENȚII CU CIROZĂ HEPATICĂ

Lilia Vlasov, Sergiu Matcovschi, Valentin Gudumac

Departamentul Medicină Internă, Clinica medicală N1, Disciplina Sinteze clinice, USMF „Nicolae Testemițanu”

## Summary

### *The role of urinary tubular enzymes in the early detection of renal kidney injury in patients with liver cirrhosis*

The routinely available clinical parameters: plasma creatinine and urea do not in practice provide either a sensitive or specific indication in the early detection of renal impairment in patients with liver cirrhosis. Clearly, more specific and sensitive markers are desirable for the early detection of an initially occult pathophysiological process. The utility of measurement of urinary tubular enzymes in predicting the renal impact was evaluated in 114 adult patients with liver cirrhosis. The enzymuria was elevated in patients with Child-Pugh B and C cirrhosis. This clearly reflects tubular injury and describe the role of enzymuria as a marker for an incipient renal impairment.

## Rezumat

Determinarea creatininei și ureei serice nu indică cu acuratețe prezența unui impact renal incipient. Pentru a studia în complexitate afectarea precoce a rinichiului în rezultatul proceselor patofiziologice din ciroza hepatică sunt necesari markeri mai sensibili ai injuriei renale. S-a estimat oportunitatea dozării enzimelor urinare la 114 bolnavii cu ciroză hepatică (CH). Aprecierea activității echipamentului enzimatic urinar a decelat prezența unei enzimurii marcate la pacienții cu ciroză hepatică clasa Child-Pugh B și C. Astfel, enzimele urinare pot servi ca markeri precoce ai afectării renale la pacienții cu CH.

## Scopul și obiectivele studiului

Dozarea creatininei în urină și aprecierea valorilor enzimelor –NAG, □□- GTP, AGN, FA, PCE urinare ca markeri timpurii ai afectării renale la pacienții cu ciroză hepatică. Determinarea și analiza valorilor enzimelor urinare la bolnavii cu ciroză hepatică clasa Child-Pugh A, B și C cu factori precipitanți ai complicațiilor renale.

## Actualitatea

S-a demonstrat că rinichiul posedă un echipament enzimatic divers, situat preponderent la nivelul nefronului. Deși în urina umană au fost detectate în jurul la 50 de enzime, doar câteva din ele sunt folosite în scopuri diagnostice. Enzimă urinară lizozomală hidrolitică N-acetil-β-glicosaminidaza (NAG) este eliberată de lizozomii celulelor epiteliale ale tubilor contorți proximali renali. Enzimele □gamma-glutamyltranspeptidaza (□□- GTP), fosfataza alcalină (FA) au o greutate moleculară mică și trec prin membrana bazală a glomerulilor, se leagă de membrana citoplasmatică tubulară a epiteliului marginii „în perie”, manifestând o activitate înaltă în anumite situații clinice și eliminându-se apoi în fluidul tubular. Alfa-glicozidaza neutră (AGN) - o altă enzimă urinară studiată este de proveniență renală și e localizată în citoplasma epiteliului marginii „în perie” a tubilor contorți proximali, iar secreția ei excesivă se semnalizează la afectarea membranei plasmatică cu pierderea structurală a microvililor. Enzimele citoplasmice - lactat dehidrogenaza și glutamat dehidrogenaza, sintetizate în mitohondrii, eliminate în cantități mari, reflectă citoliza celulelor epiteliale tubulare renale. Complexitatea intervenției enzimelor urinare în diferite situații clinice este susținută și de prezența pseudocolinesterazei (PCE) în fluidul urinar, enzimă cu masă moleculară mare sintetizată în ficat, care nu se conține în țesutul renal și practic lipsește în urina unui subiect sănătos. Apariția ei în urină denotă o micșorare a

selectivității și creșterea permeabilității membranei bazale glomerulare. Se consideră, că enzimuria excesivă este determinată atât de afectarea membranelor celulare renale, cât și de o activitatea enzimatică intensă în anumite situații clinice. Mai multe studii lansează supoziția că enzimele urinare reprezintă un element important în evaluarea afectării renale subtile din CH, cu atât mai mult că determinarea electroliților urinari cu scop de apreciere a unor posibile complicații renale la pacienții cu CH este imprecisă. Motivul este administrarea la această categorie de pacienți a unui tratament diuretic de lungă durată, care perturbază procesele fiziologice de secreție și reabsorbție. O serie de cercetări științifice recente susțin validitatea metodelor de apreciere a markerilor urinari în stratificarea unor posibile prezențe ale leziunilor tubulare și glomerulare la pacienților cu afecțiuni hepatice. Un studiu impunător, care estimează importanța predictivă a enzimei urinare NAG, a fost efectuat de către Liangos O și col. pe un eșalon de 201 pacienți spitalizați cu IRA de genă prerenală. S-a depistat creșterea enzimelor lizozomale urinare în stadiile incipiente ale IRA, inclusiv și la 42% pacienți cu CH. Recent Lisowska-Myjak B. clasifică markerii injuriei renale acute în mai multe grupe: enzimele urinare ale nefroteliului tubular - FA, GTP, alanin-aminopeptidaza, isoenzimele glutatión-transferazei, NAG, moleculele cu masă moleculară mică- alfa-1 microglobulina, beta-2 microglobulina, retinolcistein proteina 61, neutrofil gelatinaza lipocalină, citochinele și chemochinele (Gro-alfa, IL-18) și proteinele structurale ale tubilor renali - F-actina, Na(+)/H(+)

isoforma 3. Astfel, înțelegerea modificărilor patologice primare, ce au loc în tubii și glomerulii renali la pacienții cu CH, detectarea leziunilor histopatologice permit un diagnostic precoce și o conduită terapeutică adecvată în cazul apariției complicațiilor renale.

### **Obiectivele lucrării**

Estimarea semnificației enzimelor citoplasmice urinare: fosfataza alcalină (FA), gama-glutamyltranspeptidaza (Y-GTP), alfa-glicozidaza neutră (AGN), enzimei lizozomale N-acetil-B-glucozaminidaza (NAG), pseudocolinesterazei (PCE) ca markeri urinari precoce ai injuriei renale la pacienții cu ciroză hepatică.

### **Materiale și metode de cercetare**

Pentru realizarea obiectivelor studiului a fost selectat un lot de 114 de pacienți cu CH. Vârsta bolnavilor a fost cuprinsă între 31 și 70 ani (vârsta medie -  $51,5 \pm 1,56$  ani), Lotul de control a fost constituit din 20 persoane sănătoase (vârsta medie de  $48,1 \pm 2,4$  ani). S-a determinat predominarea sexului masculin versus feminin (64/50). Toți pacienții au fost grupați în 3 loturi conform clasificării cuantificate Child-Pugh. Primul lot (34 pacienți) cu ciroza clasa Child-Pugh A, al 2-lea lot (37 pacienți) cu ciroza clasa B, al 3-lea (43 pacienți) - clasa Child-Pugh C. Explorări paraclinice: examenul general al sângelui și al urinei; teste biochimice – ALAT, ASAT, bilirubina, ureea, creatinina, colesterolul total, trigliceridele, acidul uric; ionograma –  $K^+$ ,  $Na^+$ , fibrinogenul, protrombina. Ca măsură a ratei filtratului glomerular s-a folosit determinarea clearance-ului creatininei endogene după formula lui Cockcroft și Gault. Dozarea creatininei în urină și determinarea enzimelor urinare s-a efectuat după set la 114 pacienți cu CH clasa Child-Pugh A; B, C, la pacienții cu impact renal posibil: după paracenteze evacuatoare masive - 5,3% (6/114) cazuri, hemoragiile digestive superioare - 12,3% (14/113) cazuri, tratamentul agresiv cu diuretice - 26,3% (30/114), medicație nefrotoxică - 7% (8/114), peritonita bacteriană spontană în 2,6% (3/114).

### **Rezultate**

Analiza elementelor patologice din sedimentul urinar al pacienților cu CH a relevat următoarele. Proteinuria discretă (până la un 1 g în 24 ore) a fost prezentă la 9 (7,9 %) pacienți din clasa Child-Pugh A, la 22 (19,3%), pacienți din clasa Child-Pugh B și la 22 (19,3%), clasa

Child-Pugh C, în total la 53 (46,5%) bolnavi. Microhematuria s-a decelat la 7 (6,1%) pacienți cu CH clasa Child-Pugh B și 17 (14,9%) pacienți clasa Child-Pugh C. Leucocituria până la 10 leucocite a fost prezentă la 31 (27,2 %) pacienți, cilindriuria (cilindri hialini) la 45 (39,5%) pacienți. Analiza comparativă a loturilor de bază conform claselor Child-Pugh A, B și C a constatat o scădere semnificativă a diurezei la pacienții din clasa Child-Pugh C comparativ cu subiecții sănătoși ( $p < 0,001$ ), la fel între loturile 1 și 3 ( $p < 0,01$ ) și loturile 2 și 3 ( $p < 0,01$ ).

*Clearance*-ul creatininei s-a micșorat vădit la pacienții cu CH clasa Child –Pugh C comparativ cu pacienții clasa Child –Pugh A, B și subiecții sănătoși ( $p < 0,001$ ). Capacitatea de concentrare a urinei nu a fost alterată, valorile densității urinare fiind în limetele normei în loturile cercetate (tabelul 1).

**Tabelul 1. *Clearance*-ul creatininei, diureza nictimerală, valorile enzimelor urinare la pacienții cu ciroză hepatică clasa Child-Pugh A, B și C**

Indicii	1.Child-Pugh A	2.Child-Pugh B	3.Child-Pugh C	4.Lotul de control	P <sub>1,2</sub>	P <sub>1,3</sub>	P <sub>1,4</sub>	P <sub>2,3</sub>	P <sub>2,4</sub>	P <sub>3,4</sub>
	M <sub>1</sub> ±m <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> ±m <sub>2</sub>	M <sub>3</sub> ±m <sub>3</sub>	M <sub>4</sub> ±m <sub>4</sub>						
Diureza (ml in 24ore)	1080±24,8	940±67,2	552±40,60	1010±20,6	*	***	*	***	**	****
Proteinuria (g/l)	0,03±0,008	0,04±0,007	0,10±0,02	0,0±0,0	*	**	***	**	***	****
Densitatea urinară (un.)	1017±1,09	1015±1,14	1017±0,92	1020±0,77	*	*	*	*	**	*
<i>Clearance</i> creatininei (ml/min)	101±3,92	111±6,64	75,18±7,14	117±6,76	**	**	*	*	****	****
FA (nmol/s mmol creat.)	294,0±32,7	520,3±65,53	1718,2±215,35	307,2±21	*	***	*	***	**	****
□□□GTP (nmol/s mmol creat.)	239,17±26,50	526±78,98	1091±69,69	266,7±70	***	***	*	***	**	****
NAG (pmol/s mmol creat.)	3,37±0,63	4,70±0,60	12,57±0,78	1,15±0,20	*	***	**	***	****	****
PCE (nmol/s mmol creat.)	0,93±0,085	1,34±0,30	6,13±0,60	0,66±0,06	*	***	*	***	*	****
AGN (pmol/s mmol creat.)	46,9±5,67	47,3±3,87	117,3±9,00	36,94±2,7	*	***	*	***	*	****

Notă: \*  $p > 0,05$  \*\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,01$  \*\*\*\*  $p < 0,001$

Aprecierea activității echipamentul enzimatic urinar în studiul nostru ne-a permis următoarele constatări. La dozarea enzimelor urinare, valorile fosfatazei alcaline au fost crescute semnificativ în comparație cu lotul de control la pacienții clasa Child-Pugh B ( $p < 0,05$ ) și clasa Child-Pugh C ( $p < 0,001$ ), iar la 34 (29,8 %) pacienții clasa Child-Pugh A, nivelul FA în urină a fost în limitele normei ( 294,0±32,7 nmol/s mmol creat.) (tabelul 1).

La fel, valorile □-GTP, AGN, PCE, NAG au crescut substanțial la pacienții cu CH clasa Child-Pugh B și C comparativ cu subiecții sănătoși ( $p < 0,001$ ) și la comparația între loturile 2 și 3 ( $p < 0,01$ ).

Atenționăm faptul, că a fost certă atât afectarea epiteliului „marginii în perie” a tubilor renali proximali ( $\square$ -GTP, FA, AGN), cât și a lizozomilor intracelulari ai nefroteliului tubilor contorți proximali (NAG). S-a constatat creșterea permeabilității MB la pacienții cu CH decompensată cu detectarea în urină a enzimei, care nu este prezentă în sedimentul urinar normal - PCE ( $6,13 \pm 0,60$  nmol/s mmol creat.)

Creșterea activității enzimelor urinare a fost depistată și la pacienții cirofici cu prezența factorilor precipitanți ai complicațiilor renale. Administrarea tratamentului nefrototoxic și diuretic agresiv a condiționat valorile înalte ale enzimelor lizozomale NAG ( $p < 0,001$ ) și ale enzimelor membranei citoplasmatică a nefroteliului ( $\square$ -GTP, FA), ( $p < 0,001$ ), AGN ( $p < 0,001$ ) și PCE, ( $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul de control (tabelul 2). La pacienții cu CH, care au suportat paracentezele evacuatoare din motiv de imposibilitate a evacuării lichidului ascitic pe cale medicamentoasă s-a constatat o creștere semnificativă a tuturor enzimelor urinare studiate, îndeosebi a  $\square$ -GTP și FA- enzimelor membranei citoplasmatică a nefroteliului ( $p < 0,001$ ).

**Tabelul 2. Valorile enzimelor urinare și factorii precipitanți ai complicațiilor renale**

<b>Factor prec. Indicii</b>	<b>Paracenteză evacuatoare</b>	<b>Hemoragie gastrică superioară</b>	<b>Tratament nefrotoxic</b>	<b>Tratament diuretic intensiv</b>	<b>Lotul de control</b>
FA (nmol/smmol creat)	1842.88 $\pm 287.14^{***}$	840.10 $\pm 135.15^{***}$	2061.60 $\pm 408.0^{***}$	1390.01 $\pm 259.52^{***}$	307,2 $\pm 21,47$
$\square\square$ -GTP (nmol/s mmol creat.)	1214.34 $\pm 92.64^{***}$	660.16 $\pm 143.73^{**}$	1136.04 $\pm 166.96^{***}$	930.80 $\pm 108.06^{***}$	266,7 $\pm 69,69$
NAG (pmol/s mmol creat.)	11.66 $\pm 1.01^{***}$	9.68 $\pm 1.59^{***}$	13.89 $\pm 1.66^{***}$	10.53 $\pm 1.12^{***}$	1,15 $\pm 0,207$
PCE (nmol/s mmol creat.)	6.00 $\pm 1.55^{***}$	5.05 $\pm 1.23^{***}$	5.40 $\pm 1.26^{***}$	4.71 $\pm 0.78^{***}$	0,66 $\pm 0,06$
AGN (pmol/s mmol creat.)	117.32 $\pm 18.18^{***}$	82.23 $\pm 11.54^{***}$	140.56 $\pm 14.14^{***}$	102.80 $\pm 12.34^{***}$	36,94 $\pm 2,71$

Notă: \*-  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  - diferența dintre pacienții cu factori precipitanți și lotul de control.

### Discuții

Modificările nesemnificative ale sedimentului urinar obișnuit depistate și în studiul prezent, sunt insuficiente pentru diagnosticarea unui posibil impact renal incipient. Administrarea frecventă, apoi permanentă a diureticilor la pacienții cu CH decompensată complică evaluarea cu scop diagnostic a electroliților urinari.

În acest context, determinarea enzimelor urinare, ca markeri ai impactului renal la nivel de nefroteliu și MB glomerulară, este reactualizată. Enzimuria marcată a fost constatată la 37 de pacienții cu CH clasa Child-Pugh B ( $p < 0,05$ ) și 43 de pacienți clasa Child-Pugh C ( $p < 0,01$ ) comparativ cu subiecții sănătoși. S-au depistat valori înalte ale enzimelor citoplasmatică Y-GTP, FA, AGN, enzime, care se activează în exces afectarea microvililor „marginii în perie” a nefroteliului tubilor proximal renali, ale enzimelor lizozomale NAG, detectarea în urină a PCE,

enzimă, care lipsește din țesutul renal și apare în urină doar la scăderea selectivității și creșterea permeabilității MB glomerulare.

Din punct de vedere practic, sedimentul urinar la pacienții cu CH s-a dovedit a fi neinformativ, decelându-se o proteinurie, cilindrurie, hematurie nesemnificativă și modestă. Activitatea crescută a enzimelor urinare a confirmat prezența unui impact renal incipient la pacienții cu CH clasa Child-Pugh B și C. Dozarea enzimelor urinare a fost subiectul unor studii nu atât de numeroase, dar care sunt în context cu rezultatele noastre. Date relevante au fost furnizate de un studiu condus de către Liangos O. și col. pe un eșantion de 201 pacienți spitalizați cu IRA de genă prerenală. S-a demonstrat prezența unei activități înaltă a enzimelor citoplasmice urinare: FA, Y- GTP, alfa-aminopeptidaza în stadiile incipiente ale IRA.

Asamblând datele expuse, putem afirma că hipoperfuzia renală prelungită, hipoxia medularei renale, determinată de discordanțele funcționale și hemodinamice în ciroza hepatică decompensată provoacă o afectarea tubulară și glomerulară considerabilă a rinichiului. Atenționăm asupra enzimuriei marcate la pacienții cu factorilor de risc ai complicațiilor renale, îndeosebi a administrării necontrolate de diuretice, medicației nefrotoxice, efectuării paracentezelor masive evacuatoare, care au produs un impact grav asupra tubilor renali și au crescut permeabilitatea membranei bazale glomerulare la pacienții cu CH.

### **Concluzii**

1. Hipoperfuzia renală prelungită cu hipoxia tisulară la pacienții cu CH decompensată crește vulnerabilitatea nefroteliului și a MB glomerulare și poate provoca o enzimurie semnificativă.

2. La pacienții cu CH clasa Child-Pugh B și C, incluși în studiu, s-a constatat afectarea nefroteliului și creșterea permeabilității MB glomerulare, argumentată prin activitatea crescută a enzimelor membranare citoplasmice și lizozomale, decelarea enzimelor PCE în fluidul urinar.

3. Dozarea enzimelor urinare poate fi utilizată pentru diagnosticul precoce al injuriei renale la pacienții cu afecțiune hepatică, enzimuria crescută semnificativ în stadiile decompensate ale CH indicând o lezare renală incipientă.

4. S-a decelat enzimuria marcată și la pacienții cu factori de risc ai complicațiilor renale, îndeosebi la administrarea agresivă de diuretice, medicație nefrotoxică, efectuării paracentezelor masive evacuatoare,

### **Bibliografie**

1. Bruno C., Raciti C., Urso G., Neri S., Noto R. Urinary enzymes in liver cirrhosis: useful early markers of renal damage? In: *Minerva Med.* 1994 Apr;85(4), p. 155-159.
2. Basturk T., Altuntas Y., Kurklu A., Aydın L. et col. Urinary N-acetil B glucozaminidaze as an earlier marker of diabetich nephropathy and influence of low-dose perindopril indapamid combination. In: *Ren.Fail.* 2006;28(2), p. 125-128.
3. Coca S., Parikh C. Urinary biomarkers for acute kidney injury: Perspectives on translation. In: *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3, p. 481– 490.
4. Esteva-Font C., Baccaro M.E., Fernández-Llama P., Sans L., Guevara M., Ars E., Jiménez W., Arroyo V., Ballarín J. A., Ginès P. Aquaporin-1 and aquaporin-2 urinary excretion in cirrhosis: Relationship with ascites and hepatorenal syndrome. In: *Hepatology.* 2006 Dec;44(6), p. 1555–1563.
5. Gatta A., Amodio P., Frigo A., Merkel C., Milani L., Zuin R., Ruol A. Evaluation of renal tubular damage in liver cirrhosis by urinary enzymes and beta-2-microglobulin excretions. In: *Eur J Clin Invest.* 1981 Jun;11(3), p. 239-243.
6. Gudumac V., Niguleanu V., Bernic J., Rotaru L., Ciuntu A., Sali V. Explorarea urinei în laboratorul clinic. *Recomandări practice.* Chișinău, 2008, 74 p.