

ТУБУЛОПАТИИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С БЕТА-ТАЛАСЕМИЯ МАЙОР

Лилия Стоянова¹, Светла Стайкова², Трифон Червенков³

¹Клиника по вътрешни болести, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

²Клиника по нефрология, Медицински университет – Варна

³Катедра по медицинска генетика, Медицински университет – Варна

TUBULOPATHY IN PATIENTS WITH BETA THALASSEMIA MAJOR

Liliya Stoyanova¹, Svetla Staykova², Triphon Chervenkov³

¹Clinic of Internal Medicine, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

²Clinic of Nephrology, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

³Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Железният свръхтовар и развиващата се вторична хемосидероза при болните с β -таласемия майор (β -ТМ) още от ранна детска възраст водят до органни увреждания, сред които са и бъбречните нарушения. Съвременните уринни маркери – неутрофил гелатиназа-асоцииран липокалин, N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза и β 2-микроглобулин, могат да бъдат полезен инструмент за клиницистите в диагностиката на тубулните лезии. В проучването са включени 44 пациенти с β -ТМ и 30 контроли. На всички участници са изследвани маркерите за тубулна дисфункция – NGAL, β 2-MG and NAG в първа сутрешна урина чрез ELISA метод. Резултатите показват статистически значима разлика при уринния NGAL ($p=0,028$) между изследваните групи. Този биомаркер доказва много ранни увреждания в проксималния тубул преди да е настъпила клетъчната смърт.

Ключови думи: β -таласемия майор (β -ТМ), неутрофил гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL), N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (NAG), β 2-микроглобулин (β 2-MG)

ABSTRACT

The iron overload and the development of secondary hemosiderosis in patients with β -thalassemia major lead to organ damages, including kidney disorders from an early childhood. Contemporary urinary markers such as neutrophil gelatinase-associated lipocalin, β 2-microglobulin, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase could be a useful tool for clinicians in diagnosing early tubular lesions. The current study was performed in 44 patients with β -thalassemia major and 30 controls. All participants were tested for NGAL, β 2-MG, and NAG in the first sample morning urine using the ELISA method. The results showed statistically significant difference in urinary NGAL between the two examined groups. This marker indicates very early damage to the proximal tubule before cell death occurs.

Keywords: β -thalassemia major, β 2-microglobulin (β 2-MG), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG)

ВЪВЕДЕНИЕ

Пациентите с β 2-MG се характеризират с коморбидност и влошено качество на живот. Железният свръхтовар и развиващата се вторична хемосидероза още от ранна детска възраст водят до органни увреждания, сред които са и бъбречните нарушения. Някои от болните развиват гломерулна дисфункция с лека до умерена

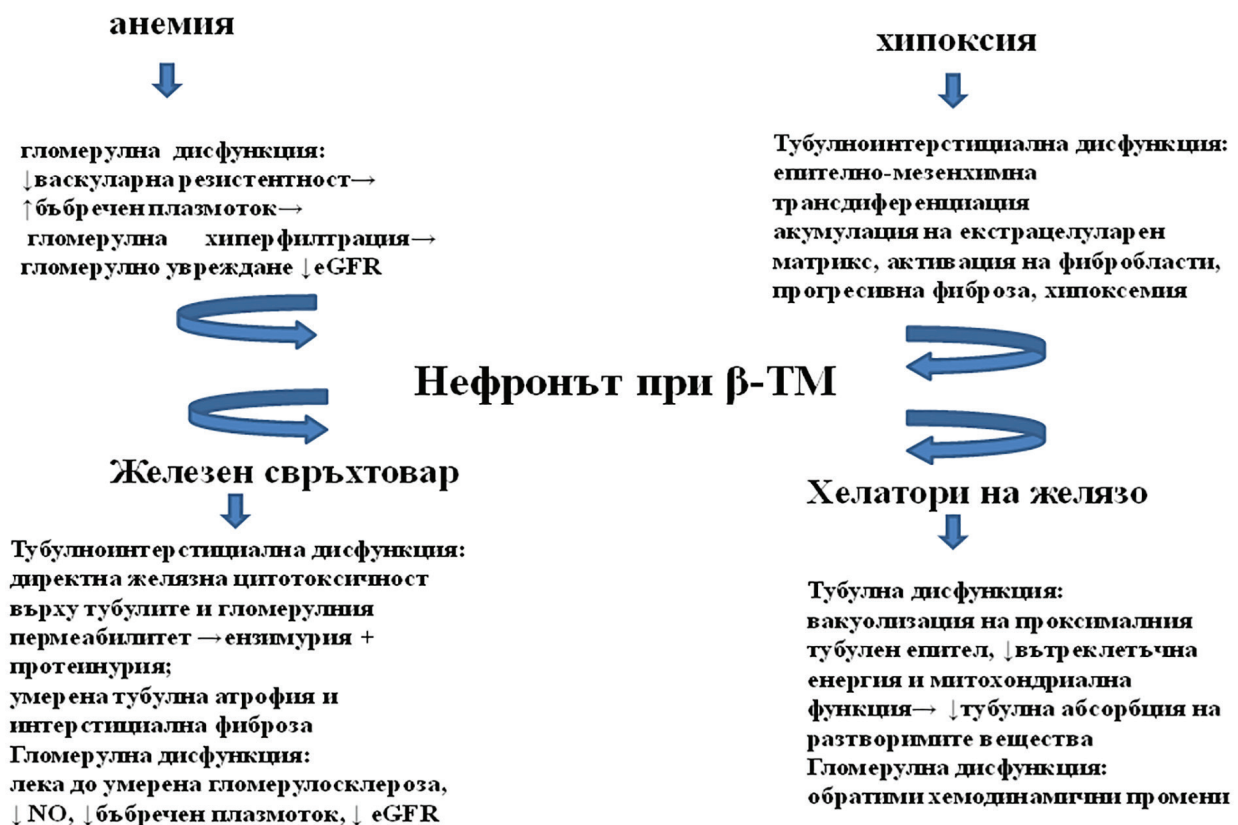
протеинурия и албуминурия, при други се наблюдават тубулни нарушения като хиперкалциурия, хиперфосфатемия, хиперурикозурия, аминокиселинна, глюкозурия (1,2,3). Зависени нива на уропротеините неутрофил гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL), β 2-микроглобулин (β 2-MG), N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (NAG) са документирани в много проучвания (1,2).

Няколко фактора са отговорни за нарушения в бъбречната функция при пациенти с β -ТМ – скъсеният живот на еритроцитите, депозитите от желязо в тъканите и терапията с желязни хелатори (3,4) (фиг. 1). Усиленият еритроцитен turnover и нуждата от чести хемотрансфузии водят до отлагане на хемосидерин в гломерулите, проксималните тубули и интерстициума с последваща бъбречна увреда (5). Реналната хемосидероза превалява при болните с β -ТМ. Желязното натрупване в бъбреците положително корелира със сигнификантно завишените стойности на цистатин С, β 2-микроглобулин, отношенията албумин/креатинин и β 2-микроглобулин/креатинин в сутрешна урина (6). Железният свръхтовар, хроничната анемия и хипоксия водят до оксидативен стрес. Намалва периферното съдово съпротивление, повишава се бъбречният плазмоток, настъпва хиперфилтрация с трансудация на макромолекули и поява на нискостепенна протеинурия (7,8). Механизмите на бъбречното увреждане в резултат на използване на хелаторна терапия не са напълно изяснени. Счита се, че приложението им може да доведе

до нарушения в бъбречната функция от транзиторно леко повишаване на серумния креатинин до остро бъбречно увреждане (9,10). Хелаторите влияят върху каскадата на арахидоновата киселина и продукцията на простагландините с последващ дисбаланс между вазодилататори и вазоконстриктори. Настъпва активация на тубулогломерулната обратна връзка и вазоконстрикция на аферентните прегломерулни артериоли с последваща редукция на гломерулната филтрация (3).

ХБЗ много често не се диагностицира преди настъпване на терминална ХБН поради липса на съществени оплаквания от страна на пациентите. При напреднало бъбречно заболяване терапевтичните възможности са ограничени. Това обяснява нарастващия интерес на клиницистите да търсят нови, неинвазивни и сензитивни маркери за ренална дисфункция.

Неутрофилен гелатиназа-асоцииран липокалин е протеин с молекулна маса 25 kDa, описан за първи път през 1993 г. (12,13). В състояние на стрес (инфекции, възпаления, исхемия, неопластична пролиферация) се наблюдава подчертана експресия на NGAL в увредените епителни клетки както в бъбрека, така и в



Фиг. 1. Механизми на тубулна и гломерулна дисфункция при пациентите с таласемии (12)

дебелото черво, черния дроб, белите дробове (14). NGAL свободно се филтрира през гломерула и в голяма степен се реабсорбира в проксималния тубул. Екскрецията на NGAL вероятно се дължи на бъбречна увреда със засягане на реабсорбцията в проксималния тубул и/или индуциране на синтеза de novo на NGAL в дисталния тубул.

N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза е лизозомален ензим в проксималните тубулни клетки на бъбрека и може да служи за маркер за проксимална тубулна увреда и нефротоксичност. Има високо молекулно тегло около 130 000–140 000 Da, поради което не се филтрира през гломерулната базална мембрана, а се метаболизират в черния дроб. Високото ниво на уринния NAG е индикатор за тубулно увреждане в резултат на исхемия, възпаление, токсичност (15).

Бета-2-микроглобулинът е белтък с молекулна маса 11,58 kD, който се съдържа в клетъчната мембрана на всички еукариотни клетки. Той изцяло се филтрира, а във 99,9% се реабсорбира в проксималния тубул. При наличие на тубулни лезии неговите стойности в урината се увеличават, а откриването му в нея е маркер за нарушена тубулна реабсорбция – тубулопатия (16).

ЦЕЛ

Да се направи оценка на съвременните уринни маркери NGAL, NAG, β 2-MG в диагностиката на ранна бъбречна увреда при пациенти с β -ТМ.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Пациентите, участници в проучването, са 44 на брой, от 7 г. до 57 г., на средна възраст $24,3 \pm 12,71$ г., от които 18 деца (6 момичета и 12 момчета) и 26 възрастни (14 жени и 12 мъже). Изследването е извършено през периода: септември 2018 г. – август 2019 г. Диагнозата β -ТМ е доказана чрез електрофореза на хемоглобина.

Включващи критерии: болни с β -ТМ, подписали информирано съгласие.

Исключващи критерии: болни с β -ТМ и захарен диабет, хронични гломерулонефрити, неконтролирана артериална хипертония, активни инфекции на пикочните пътища, сепсис,

онкологично заболяване, бременност, прием на нефротоксични лекарства, провеждане на йод-контрастни изследвания през последния месец, лица, неподписали информирано съгласие.

В контролната група са включени 30 здрави лица на възраст от 7 г. до 45 г., от които 13 деца (9 момичета и 4 момчета) и 17 възрастни (12 жени и 5 мъже), на средна възраст $23,63 \pm 12,84$ г.

Изследването на уропротеините NGAL, NAG, β 2-MG е извършено от първа урина за деня, средна фракция, в стерилен контейнер. Урината е центрофугирана при 3000 оборота в минута за 20 минути и надстоящата течност е отделена, замразена и съхранявана при -20°C до провеждането на анализа. Определянето на β -2-микроглобулин в урина е извършено чрез ELISA с готов тестов набор Human β 2-Microglobulin Assay, каталожен номер KGE019 на фирмата R&D Systems, Великобритания, според протокола на производителя при разреждане на урината 2 пъти. Концентрацията е изразена в мерна единица $\mu\text{g/mL}$. Определянето на липокалин-2/NGAL в урина е извършено чрез ELISA с готов тестов набор Human Lipocalin-2/NGAL Immunoassay, каталожен номер DLCN20 на фирмата R&D Systems, Великобритания, според протокола на производителя при разреждане на урината 10 пъти. Концентрацията е изразена в мерна единица ng/mL . Определянето на N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза в урина е извършено чрез ELISA с готов тестов набор Human N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) ELISA Kit, каталожен номер HUEB0419 на фирмата ELISAGenie, Великобритания, според протокола на производителя без разреждане на урината. Концентрацията е изразена в мерна единица U/L.

Статистически методи

Използвани са дескриптивни, графични и аналитични методи.

T-test е прилаган за сравняване на средните величини на показателите между контроли и болни. Статистически значими са разликите между групите при $p \leq 0,05$.

Корелационен анализ е използван за изследване на зависимостите между клиничните показатели. Оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на ре-

зултатите от коефициента на Пирсън (r). Степента на асоциация между променливите е определяна като значителна при $r > 0.5$ и $r = 0.7$; голяма при $r > 0.7$ и $r = 0.9$ и изключително голяма при $r > 0.9$ при $p \leq 0.05$.

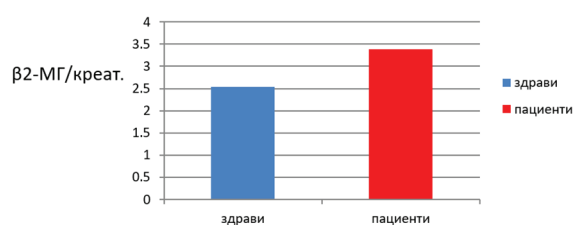
РЕЗУЛТАТИ

Подбрана е референтна група според изискванията на IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) и са изработени референтни граници на изследваните лабораторни параметри, представени в посочените дименсии: $\beta 2$ -микроглобулин/креатинин mg/mol, NGAL/креатинин ng/mol., NAG/креатинин U/mol. (табл. 1).

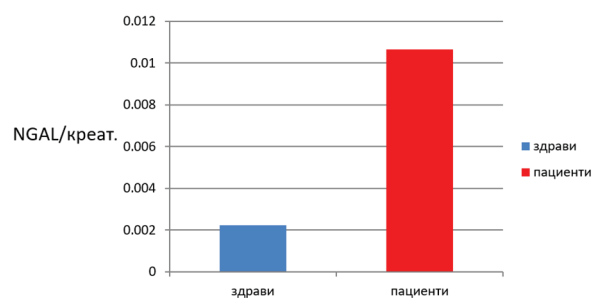
На табл. 2 са представени корелации между параметрите $\beta 2$ -МГ/креатинин, NGAL/креатинин, NAG/креатинин при болни и контроли чрез Mann-Whitney U-Test.

Установява се статистически значима разлика при показателя NGAL/креатинин ($p=0,028$) между изследваните групи. Разликите на посочените показатели са представени графично (фиг. 2, фиг. 3, фиг. 4).

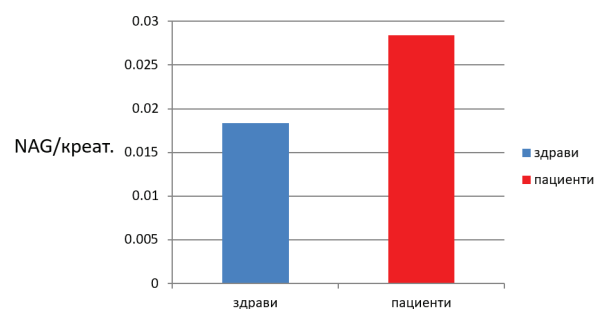
От корелационния анализ се установява положителна корелативна връзка между $\beta 2$ -МГ/



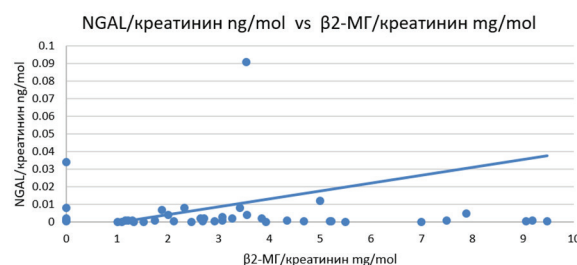
Фиг. 2. Разлика в $\beta 2$ -МГ/креатинин при пациенти и здрави контроли



Фиг. 3. Разлика в NGAL/креатинин при пациенти и здрави контроли



Фиг. 4. Разлика в NAG/креатинин отношение при пациенти и здрави контроли



Фиг. 5. Корелация между нивата на $\beta 2$ -МГ и NGAL при пациентите с β -ТМ

Табл. 1. Граници на стойностите за изследваните биохимични биомаркери при контролната група

Биомаркер	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност	Стандартно отклонение
$\beta 2$ -MG/creatinine	0	8,3650	2,531000	$\pm 2,1676115$
NGAL/creatinine	0	0,0190	0,002233	$\pm 0,0037268$
NAG/creatinine	0,0002	0,1800	0,018363	$\pm 0,0353029$

Табл. 2. Mann-Whitney U-Test

Биомаркер	Контроли	Пациенти	U test/ Z	P
$\beta 2$ -MG/creatinine	$2,5310 \pm 2,1676$	$3,393 \pm 2,7238$	-1,59	0,116
NGAL/creatinine	$0,0022 \pm 0,0037$	$0,0106 \pm 0,040$	2,25	0,028
NAG/creatinine	$0,0183 \pm 0,0353$	$0,0283 \pm 0,0706$	-0,89	0,375

Табл. 3. Корелация на Pearson

		NGAL/ креатинин	NAG/ креатинин	β2-МГ/ креатинин
NGAL/ креатинин	Pearson Correlation	1	-0.011	0.297
	P		0.944	0.050
	N	44	44	44
NAG/ креатинин	Pearson Correlation	-0.011	1	-0.231
	P	0.944		0.132
	N	44	44	44
β2-МГ/ креатинин	Pearson Correlation	0.297	-0.231	1
	P	0.050	0.132	
	N	44	44	44

креатинин и NGAL/креатинин отношения ($p=0.050$, $r=0.297$) (табл. 3).

Корелационните зависимости между β2-МГ и NGAL са представени графично (фиг. 5).

ОБСЪЖДАНЕ

За първи път в България се провежда проучване върху тубулните нарушения при болните с β-ТМ. Уропротеините NGAL, NAG, β2-МГ дават допълнителна информация за тубулопатиите при таласемичните пациенти. Установява се статистически значима разлика при уринния NGAL между изследваните групи. Нашите резултати потвърждават тези от световната литература за завишени нива на NGAL/креатинин отношение при пациентите с β-ТМ.

NGAL и β2-МГ се откриват в нищожни количества в урината на здрави индивиди. Тяхната детекция свидетелства за нарушения на тубулната резорбция на разтворимите вещества. NAG се явява малко по-късен показател в диагностиката на тубулопатиите. Откриването му в урината е доказателство за лизис на клетката. В този смисъл нашето проучване доказва много ранни нарушения в тубулната функция при болните с β-ТМ, още преди да е настъпила клетъчната смърт.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уропротеините NGAL, NAG и β2-МГ могат да бъдат полезен инструмент за клиницистите при установяване на тубулни нарушения при пациентите с β-ТМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Renal tubular function in patients with beta-thalassaemia major in Zahedan, southeast Iran, Sadeghi-Bojd S, Hashemi M, Karimi M. Singapore Med J. 2008 May;49(5):410-2. PMID: 18465053;
2. Renal tubular dysfunction in pediatric patients with beta-thalassemia major. Ahmadzadeh A, Jalali A, Assar S, Khalilian H, Zandian K, Pedram M. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2011 May; 22(3):497-500. PMID: 2156630;
3. Ponticelli C, Musallam KM, Cianciulli P, Cappellini MD: Renal complications in transfusion-dependent beta thalassaemia. Blood Rev 24: 239–244, 2010;
4. Musallam KM, Taher TA. Mechanisms of renal disease in β-thalassemia. J Am Soc Nephrol. 2012;23:1299–1302;
5. Zhou XJ, Laszik Z, Wang XQ, Silva FG, Vaziri ND. Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis. Lab Invest. 2000;80:1905–1914;
6. Hashemieh M, Radfar M, Azarkeivan A, Mohammad S, Tabatabaei T, Nikbakht S, Yaseri M, Sheibani K., Renal Hemosiderosis among Iranian Transfusion Dependent β-Thalassemia Major Patients, Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2017 Apr 1; 11(2): 133–138;
7. Hashemieh M, Radfar M, Azarkeivan A, Mohammad S, Tabatabaei T, Nikbakht S, Yaseri M, Sheibani K., Renal Hemosiderosis among Iranian Transfusion Dependent β-Thalassemia Major Patients, Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2017 Apr 1; 11(2): 133–138;
8. Grossman H, Dische MR, Winchester PH, Canale V. Renal enlargement in thalassemia major. Radiology.1971;100:645–648;
9. Badeli H, Baghersalimi A, Eslami S et al., Early Kidney Damage Markers after Deferasirox Treatment in Patients with Thalassemia Major: A Case-Control Study, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2019, Article ID 5461617, 8 pages, 2019;
10. Cappellini M D, Porter J B, Quebe-Fehling E, Pallaud C, Dieterle F., Exploring the Clinical Utility of Renal Safety Biomarkers During Iron Chelation

- Therapy. Journal of Nephrology & Kidney Diseases. 2018; 1(2):119;
11. Mallat N., Mallat S., Musallam K., Taher A., Potential mechanisms for renal damage in beta-thalassemia, JNephrol 2013; 26(5): 821-828;
 12. Kalousek I, Röselová P, Otevrellová P. NGALneutrophil gelatinase associated lipocalin in biochemistry, physiology and clinical praxis. Cas Lek Cesk, 2006, 145(5), 373-376;
 13. Kjeldsen L, Cowland BJ, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse – Biochim. Biophys. Acta, 2000, 1482(1-2), 272-283;
 14. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. Biomarkers Med, 2010, 4(2), 265-280;
 15. Mohkam M, Ghafari A. The Role of Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in Diagnosis of Kidney Diseases. J Ped. Nephrology 2015;3(3):84-91;
 16. Barton K. T, Kakajiwal A, Dietzen D. J., Goss C. W., Gu H., Dharnidharka V. R., Using the newer Kidney Disease: Improving Global Outcomes criteria, beta-2-microglobulin levels associate with severity of acute kidney injury, Clinical Kidney Journal, Volume 11, Issue 6, December 2018, Pages 797–802.

Адрес за кореспонденция:
Д-р Лилия Иванова Стоянова
Клиника по вътрешни болести,
МБАЛ „Св. Марина“ – Варна
бул. „Христо Смирненски“ 1
Варна, 9010
e-mail: lilstoianova67@abv.bg