

Мочевая экскреция коллагена IV типа – ранний маркер фиброзирования почек при сахарном диабете

¹Бондарь И.А., ¹Климонтон В.В., ¹Парфентьева Е.М., ²Романов В.В., ¹Надеев А.П.

¹ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск
(ректор – проф. И.О. Маринкин)

²ООО «Лабораторная диагностика ИНВИТРО», Новосибирск
(директор – Е.В. Печковский)

Цель. Определить диагностическое значение исследования мочевой экскреции коллагена IV типа у больных сахарным диабетом 1 типа (СД1) с различными стадиями диабетической нефропатии.

Материалы и методы. У 60 больных СД1, в том числе у 23 с нормальной альбуминурией, у 28 – с микроальбуминурией и у 9 с макроальбуминурией определена экскреция коллагена IV типа с мочой иммуноферментным методом. Контрольную группу составили 10 здоровых лиц. Биопсия почек выполнена у 22 больных. У 11 проведено исследование депозитов коллагена IV типа с помощью иммуногистохимии.

Результаты. Экскреция коллагена IV типа нарастала по мере увеличения выраженности диабетической нефропатии, коррелируя с отношением альбумин/креатинин мочи, уровнем креатинина и мочевины крови, параметрами систолического и диастолического артериального давления в дневные и ночные часы. Пациенты с избыточной аккумуляцией коллагена IV типа в почечных клубочках имели достоверно более высокие показатели коллагена IV типа в моче.

Заключение. Определение мочевой экскреции коллагена IV типа может использоваться для раннего выявления фиброза почек у больных СД1.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, диабетическая нефропатия, коллаген IV типа

Urinary excretion of type IV collagen as an early marker of renal fibrosis in patients with diabetes mellitus

¹Bondar I.A., ¹Klimontov V.V., ¹Parfentyeva E.M., ²Romanov V.V., ¹Nadeev A.P.

¹Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

²Ltd. "INVITRO", Novosibirsk

Aim. To determine the diagnostic value of urinary excretion of type IV collagen in patients with type 1 diabetes with different stages of nephropathy.

Methods. Urinary type IV collagen was determined in 60 patients with type 1 diabetes (23 with normal albuminuria, 28 with microalbuminuria and 9 with macroalbuminuria) by an enzyme immunoassay. 10 healthy individuals were acted as the control group. Renal biopsy was performed in 22 patients. Deposits of type IV collagen were revealed by 11 individuals by immunohistochemistry.

Results. The urinary excretion of type IV collagen increased with severity of diabetic nephropathy, correlating with the urinary albumin/creatinine ratio, serum creatinine and parameters of daytime and nighttime systolic and diastolic blood pressure. Patients with excessive accumulation of type IV collagen in the glomeruli had significantly higher level of type IV collagen in the urine.

Conclusion. The determination of urinary type IV collagen can be used for early detection of renal fibrosis in patients with type 1 diabetes.

Key words: type 1 diabetes mellitus, diabetic nephropathy, type IV collagen

Нарушения обмена компонентов внеклеточного матрикса, прежде всего коллагена, играют центральную роль в формировании диабетической нефропатии (ДН). Фиброз клубочков и интерстиция почек, развивающийся у больных сахарным диабетом (СД), характеризуется патологическим накоплением коллагенов I, III, IV и VI типа в этих структурах [1]. Поэтому показатели обмена коллагена изучаются в качестве потенциальных диагностических маркеров фиброза почек при ДН [2].

Основным компонентом базальных мембран и мезангиального матрикса клубочков почек является коллаген IV типа. В последние годы разработаны коммерческие тест-системы для его количественного определения в моче. В ряде работ показано увеличение мочевой экскреции коллагена IV типа у больных СД 2 типа (СД2) с нефропатией [3–5]. Взаимосвязь экскреции коллагена IV типа с развитием диабетического нефросклероза требует уточнения.

Целью нашего исследования стало определение диагностического значения мочевой экскреции коллагена IV типа у больных СД 1 типа (СД1) с различными стадиями ДН.

Материалы и методы

Обследовано 60 больных СД1, 30 мужчин и 30 женщин, в возрасте от 16 до 50 лет (медиана 29 лет), с длительностью заболевания от одного месяца до 43 лет (медиана 7 лет). Уровень гликирован-

ного гемоглобина A1c (HbA_{1c}) варьировал от 4,8 до 18% (медиана 9,6%). В исследование не включались больные с кетоацидозом, патологией почек недиабетического генеза, хронической болезнью почек IV–V стадий, инфекцией мочевыводящих путей, с обострением сопутствующих заболеваний.

В зависимости от величины экскреции альбумина с мочой (ЭАМ) больные были распределены на 3 группы: с нормальной альбуминурией (23 пациента, 1-я группа), с микроальбуминурией (28 человек; 2-я группа), с макроальбуминурией (9 больных; 3-я группа). У трех пациентов с макроальбуминурией выявлен нефротический синдром, у шести – снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) менее 60 мл/мин/1,73 м².

Клиническое обследование проводилось в условиях эндокринологического отделения Государственной Новосибирской областной клинической больницы. Всем пациентам проводили УЗИ почек, определение суточной протеинурии, альбуминурии, исследование осадка мочи. СКФ рассчитывали по формуле Кокрофта-Голта. Суточное мониторирование артериального давления (СМАД) проводили осциллометрическим методом на аппарате «Топoport IVa» фирмы «Marquette HELLIGE» (США).

У 22 пациентов (7 с нормальной ЭАМ, 13 с микроальбуминурией и 2 с макроальбуминурией) диагноз ДН был верифицирован морфологически при исследовании биоптатов почек с помощью световой и электронной микроскопии. Пункционная нефроби-

опсия проводилась по клиническим показаниям с целью определения характера и выраженности поражения почек при наличии повышенной ЭАМ или факторов риска ДН (диабетическая ретинопатия, артериальная гипертензия, длительность СД более 15 лет). У 11 пациентов (в том числе у 4 с нормальной ЭАМ и у 7 с микроальбуминурией) проведено иммуногистохимическое типирование коллагена IV типа в клубочках и в интерстиции почек стрептовидин-биотиновым методом с помощью моноклональных антител фирмы «Novocastra Laboratories Ltd» (Великобритания).

Исследование содержания коллагена IV типа проводили в утренней порции мочи методом иммуноферментного анализа с помощью наборов фирмы «Argutus Medical Ltd» (Ирландия) с использованием планшеточного ридера «BioRad 680» (фирма «BioRad», США) и программного обеспечения «Zemfira». Результаты приводили к величине экскретируемого креатинина и сравнивали со значениями в контрольной группе, состоявшей из десяти здоровых лиц (3 мужчины, 7 женщин, от 21 до 50 лет, без наследственной отягощенности по СД).

Проведение исследования одобрено Комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 22 от 19. 03. 2010 г.). Пациенты давали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическая обработка проведена с использованием пакета STATISTICA 6.0. Учитывая, что распределение большинства изученных признаков было отличным от нормального, применяли методы непараметрической статистики. Межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна-Уитни и ANOVA Краскала-Уоллиса. Взаимосвязь признаков изучали с помощью рангового корреляционного анализа Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Данные представлены как медианы, 25-е и 75-е проценты.

Результаты

Клинико-лабораторная характеристика групп представлена в таблице 1. Пациенты с выраженной нефропатией ожидаемо отличались большей длительностью СД, более высокими показателями креатинина и меньшей СКФ. Качество контроля гликемии достоверно не различалось в выделенных группах.

Мочевая экскреция коллагена IV типа у больных СД нарастала по мере увеличения выраженности поражения почек (рис. 1). У пациентов с нормоальбуминурией зафиксирована тенденция к повышению показателя по сравнению со здоровыми лицами ($p=0,14$). У больных с микроальбуминурией экскреция коллагена достоверно превышала контроль ($p=0,04$). Наибольшее содержание коллагена в моче выявлено у больных с макроальбуминурией. Медиана экскреции в этой группе превышала показатель в контроле в 5,3 раза и была достоверно выше, чем у больных с нормо- и микроальбуминурией (все $p<0,005$).

Таблица 1

Характеристика групп больных СД1 с разными стадиями ДН			
Показатель	Группы больных		
	1-я (n=23)	2-я (n=28)	3-я (n=9)
Возраст, годы	27 (20; 34)	30,5 (25; 39,5)	35 (23; 45)
Длительность СД, годы	3 (0,2; 7)	10,5 (6; 16)	17 (11; 21)*
HbA _{1c} , %	9,1 (8,5; 10,4)	9,7 (8,1; 11,9)	10,4 (9,5; 11,7)
Креатинин крови, мкмоль/л	82 (75; 93)	81 (74; 89)	123 (119; 130)
СКФ, мл/мин/1,73 м ²	93,6 (83; 114,7)	123 (99,3; 125,5)	68,9 (63; 74,7)*

Примечание: * – достоверное различие с 1-й и 2-й группой больных

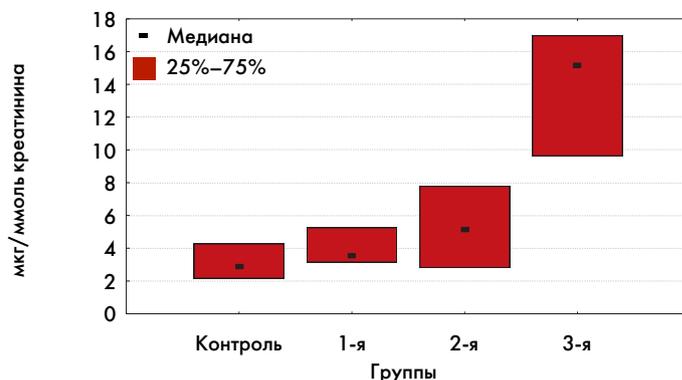


Рис. 1. Мочевая экскреция коллагена IV типа у больных СД с различными стадиями ДН

Повышенные индивидуальные значения, превышающие верхнюю границу 95% доверительного интервала в контроле (4,32 мкг/ммоль креатинина), выявлены у девяти обследованных с нормоальбуминурией (39,1%), у 15 – с микроальбуминурией (53,6%) и у всех больных с протеинурией (100%).

Пациенты с нормальной ЭАМ и повышенной экскрецией коллагена отличались от остальных пациентов с нормоальбуминурией более высокими усредненными показателями постпрандиальной гликемии (медиана 10,3 и 7,3 ммоль/л соответственно, $p=0,03$) и тенденцией к более высоким значениям HbA_{1c} (9,7 и 9,1%, $p>0,05$). Два пациента с нормоальбуминурией и гиперэкскрецией коллагена имели постоянную артериальную гипертензию, еще у двух фиксировались подъемы АД в анамнезе. Среди больных с нормальной экскрецией коллагена и нормоальбуминурией артериальная гипертензия не зафиксирована ни в одном случае.

При ранговом корреляционном анализе установлены достоверные прямые взаимосвязи между экскрецией коллагена IV типа и соотношением альбумин/креатинин мочи ($r=0,52$), уровнем креатинина и мочевины крови ($r=0,38$ и $r=0,40$ соответственно, все $p<0,05$). Корреляция с СКФ оказалась слабой и недостоверной ($r=-0,11$, $p>0,05$). Экскреция коллагена коррелировала с параметрами СМАД: средним дневным и ночным систолическим АД ($r=0,55$ и $r=0,40$ соответственно), средним дневным и ночным диастолическим АД ($r=0,51$ и $r=0,59$ соответственно); наиболее тесная корреляция выявлена с максимальным диастолическим АД в ночные часы ($p=0,71$). Не обнаружено значимых корреляций между экскрецией коллагена и параметрами углеводного обмена, суточной дозой инсулина, возрастом больных и длительностью СД.

При морфологическом исследовании почек во всех случаях был подтвержден диагноз ДН. При окраске по ван Гизон определялось диффузное расположение коллагеновых волокон в клубочках, более выраженное у больных с микро- и макроальбуминурией. Увеличение объема мезангия клубочков зафиксировано у 15 больных, перигломерулярный склероз – у 10, склероз интерстиция – у 7 пациентов. При иммуногистохимическом исследовании избыточная аккумуляция коллагена IV типа в клубочках (диффузно-очаговый тип окрашивания, резко положительная реакция) была обнаружена у 5 из 11 больных, в т.ч. у 2 больных с нормоальбуминурией и у 3 с микроальбуминурией. У больных с избыточной аккумуляцией коллагена IV типа его экскреция с мочой была достоверно выше, чем у больных с нормальной иммуногистохимической реакцией на коллаген ($p=0,047$; рис. 2).

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие ДН у больных СД1 сопровождается увеличением экскреции коллагена IV типа с мочой. Наибольшие значения экскреции коллагена определены у пациентов с макроальбуминурией, что соответствует представлениям об интенсивном формировании фиброза почек на этой стадии ДН [1]. В работах других авторов также зафиксиро-

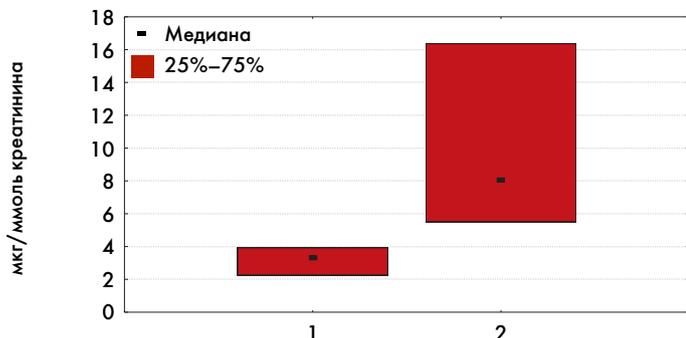


Рис. 2. Мочевая экскреция коллагена IV типа у больных СД с нормальным (1) и избыточным (2) содержанием коллагена IV типа в клубочках

вана положительная связь между мочевой экскрецией коллагена IV типа и альбумина у больных СД [3, 5, 6]. Экскреция коллагена IV типа оказалась взаимосвязана с развитием артериальной гипертензии. Для верификации последней нами использован метод СМАД, способный фиксировать начальные этапы развития артериальной гипертензии у больных с ДН, которые не всегда выявляются при разовых измерениях АД [7]. Экскреция коллагена коррелировала с рядом параметров СМАД, наиболее тесно – с максимальным диастолическим давлением ночью. Ранее взаимосвязь между экскрецией коллагена IV типа и уровнем АД была описана при СД2 [3] и при патологии почек недиабетического генеза [8]. По данным проспективного исследования S. Araki и соавт., мочевая экскреция коллагена IV типа и артериальная гипертензия ассоциированы с ежегодным снижением СКФ у больных СД2 [5]. Хорошо известно, что артериальная гипертензия – один из наиболее важных патогенетических факторов фиброза почек [9]. Это в очередной раз подчеркивает важность раннего выявления и контроля артериальной гипертензии при СД.

В рамках данной работы нами впервые проведено сравнительное изучение аккумуляции коллагена IV типа в почках и его экскреции с мочой у больных СД1 с начальными стадиями ДН. Оказалось, что гиперэкскреция коллагена IV типа у пациентов с нормальной ЭАМ и микроальбуминурией отражает начальные этапы аккумуляции данного типа коллагена в почках. Ранее описана взаимосвязь между повышением мочевой экскреции колла-

гена IV типа и увеличением объема мезангия клубочков у мышей линии db/db (модель СД2) [10]. У больных СД2 экскреция коллагена IV типа была связана с морфологическими изменениями клубочков, канальцев и интерстиция почек и отражала накопление коллагена в этих структурах [4].

Различия диагностического значения экскреции с мочой коллагена и альбумина связаны с тем, что коллагенурия в большей степени связана с развитием почечного фиброза, в то время как альбуминурия отражает проницаемость почечного фильтра. Повышенная экскреция коллагена зарегистрирована нами у 39% больных с нормаальбуминурией. В других исследованиях частота гиперэкскреции коллагена IV типа у больных СД с нормальной ЭАМ варьировала от 26% [11] до 45% [6]. По нашим данным, гиперэкскреция коллагена может наблюдаться у больных с нормаальбуминурией, имеющих артериальную гипертензию и неудовлетворительный контроль гликемии. Вероятно, эти пациенты входят в группу риска по дальнейшему развитию ДН.

Таким образом, определение коллагена IV типа в моче является чувствительным тестом для ранней диагностики фиброза почек при СД1. Прогностическое значение мочевой экскреции коллагена IV типа при ДН нуждается в проверке в проспективных исследованиях.

Заключение

Проведенное исследование свидетельствует о повышении мочевой экскреции коллагена IV типа по мере развития ДН у больных СД1. Экскреция коллагена IV типа прямо коррелирует с альбуминурией, параметрами систолического и диастолического АД и отражает начальные этапы аккумуляции коллагена в почках. Таким образом, определение мочевой экскреции коллагена IV типа может использоваться для ранней неинвазивной диагностики фиброза почек при СД.

Работа выполнена в рамках научного проекта, поддержанного грантом Президента Российской Федерации по государственной поддержке молодых российских ученых – докторов наук (грант МД-5725.2010.7).

Авторы декларируют отсутствие двойственности (конфликта) интересов, связанных с рукописью.

Литература

1. Бондарь И.А., Климонтов В.В. Функциональная морфология почек при сахарном диабете. // Сахарный диабет и хроническая болезнь почек / Под ред. М.В. Шестаковой, И.И. Дедова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2009. – С. 149–176.
2. Бондарь И.А., Климонтов В.В. Ранние маркеры диабетической нефропатии // Клиническая нефрология. – 2010. – № 2. – С. 60–65.
3. Kotajima N., Kimura T., Kanda T., Obata K., Kuwabara A., Fukumura Y., Kobayashi I. Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus // J. Diabetes Complications. – 2000. – Vol. 14. – P. 13–17.
4. Okonogi H., Nishimura M., Utsunomiya Y., Hamaguchi K., Tsuchida H., Miura Y., Suzuki S., Kawamura T., Hosoya T., Yamada K. Urinary type IV collagen excretion reflects renal morphological alterations and type IV collagen expression in patients with type 2 diabetes mellitus // Clin. Nephrol. – 2001. – Vol. 55, № 5. – P. 357–364.
5. Araki S., Haneda M., Koya D., Isshiki K., Kume S., Sugimoto T., Kawai H., Nishio Y., Kashiwagi A., Uzu T., Maegawa H. Association between urinary type IV collagen level and deterioration of renal function in type 2 diabetic patients without overt proteinuria // Diabetes Care. – 2010. – Vol. 33, № 8. – P. 1805–1810.
6. Iijima T., Suzuki S., Sekizuka K., Hishiki T., Yagame M., Jinde K., Saotome N., Suzuki D., Sakai H., Tomino Y. Follow-up study on urinary type IV collagen in patients with early stage diabetic nephropathy // J. Clin. Lab. Anal. – 1998. – Vol. 12, № 6. – P. 378–382.
7. Бондарь И.А., Климонтов В.В., Королева Е.А., Желтова Л.И. Суточная динамика артериального давления у больных сахарным диабетом типа 1 с нефропатией // Пробл. эндокринологии. – 2003. – № 5. – С. 5–10.
8. Furumatsu Y., Nagasawa Y., Shoji T., Yamamoto R., Iio K., Matsui I., Takabatake Y., Kaimori J. Y., Iwatani H., Kaneko T., Tsubakihara Y., Imai E., Isaka Y., Rakugi H. Urinary type IV collagen in nondiabetic kidney disease // Nephron. Clin. Pract. – 2011. – Vol. 117, № 2. – P. 160–166.
9. Дедов И. И., Шестакова М. В. Сахарный диабет и артериальная гипертензия. – М.: Медицинское информационное агентство, 2006. – С. 99–110.
10. Cohen M. P., Lautenslager G. T., Shearman C. W. Increased urinary type IV collagen marks the development of glomerular pathology in diabetic db/db mice // Metabolism. – 2001. – Vol. 50, № 12. – P. 1435–1440.
11. Cawood T.J., Bashir M., Brady J., Murray B., Murray P. T., O'Shea D. Urinary collagen IV and α 1G1: potential biomarkers for detecting localized kidney injury in diabetes-a pilot study // Am. J. Nephrol. – 2010. – Vol. 32, № 3. – P. 219–225.

Бондарь Ирина Аркадьевна

д.м.н., проф., зав. кафедрой эндокринологии, ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

Климонтов Вадим Валерьевич

д.м.н., доц. кафедры эндокринологии, ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

E-mail: klimontov@mail.ru

Парфентьева Екатерина Михайловна

аспирант кафедры эндокринологии, ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

Романов Вячеслав Витальевич

к.м.н., зав. лабораторией, ООО «Лабораторная диагностика ИНВИТРО», Новосибирск

Надеев Александр Петрович

д.м.н., проф. кафедры патологической анатомии, ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск