

Оценка субфракционного состава мочи у больных сахарным диабетом 2 типа с использованием метода лазерной корреляционной спектроскопии

С.Б. Шустов¹, О.А. Нагибович¹, В.М. Захарченко², В.Л. Эмануэль³,
Л.А. Хоровская³, М.М. Захарченко², С.Б. Ланда⁴

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова

² НИИЦ (МБЗ) ГНИИИВМ МО РФ

³ Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. И.П. Павлова

⁴ Институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, Санкт-Петербург

Диабетическая нефропатия (ДН) считается одним из самых тяжелых и опасных осложнений сахарного диабета (СД) [2, 6, 8] и является одной из ведущих причин хронической почечной недостаточности (ХПН) [1, 15, 19]. В первую очередь это относится к больным СД 2 типа, удельный вес которых среди диабетической популяции достигает 90% [5, 7, 20].

Организация информативной системы диагностики и адекватного лечения начальных стадий поражения почек при СД могла бы привести к снижению риска возникновения ХПН, существенно влияющей на качество жизни пациентов [2, 8, 17]. Имеется значительное количество клинических и экспериментальных данных об обратимости патологических процессов в почечной паренхиме до развития клинически выраженной нефропатии [3, 18], а, как известно, затраты на диагностику и лечение одного больного с доклинической стадией ДН во много раз ниже затрат на одного больного с ХПН [12, 13, 16].

Существующие методы диагностики физических параметров мочи, с помощью которых имеется возможность выявлять ранние признаки поражения почек у больных СД 2 типа, требуют усовершенствования, а широкое использование скрининга начальных стадий ДН, по данным [12, 13], позволит решить проблему как с медицинских, так и с экономических позиций.

Целью настоящего исследования явилась оценка субфракционного состава (СС) мочи с помощью лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) у больных СД 2 типа с различными стадиями ДН.

Материалы и методы исследования

Клинические наблюдения проведены в период с 1998 по 2002 г. на базе кафедры терапии усовершенствования врачей Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. В состав конечной выборки было включено 80 больных СД 2 типа и 23

практически здоровых лица (контрольная группа). Соотношение мужчин и женщин в группе больных диабетом составило 1,7:1; в контрольной группе — 1,6:1. Возраст больных СД от 39 лет до 71 года (в среднем $54,9 \pm 0,8$ лет). Длительность диабетического анамнеза колебалась от 1 года до 30 лет (в среднем $10,1 \pm 1,1$ лет).

Всем пациентам проводилось комплексное клиничко-лабораторное обследование, включавшее общеклинические методы исследования с изучением жалоб, анамнеза и объективного статуса, общеклинические лабораторные исследования, биохимический анализ крови и мочи, а также изучение СС мочи по методу ЛКС. Стадия ДН устанавливалась в соответствии с классификацией С.Е. Mogensen [19].

Более детально исследовалось функциональное состояние почек. Альбуминурию определяли методом конкурентного иммуно-рецепторного анализа с заменой антител на рекомбинантный альбуминсвязывающий рецепторный белок стрептококка группы G [11], протеинурию — унифицированным методом Брандберга-Робертса-Стольниковца [4]. Функциональный почечный резерв оценивали с помощью нагрузочной пробы с белком по изменению скорости клубочковой фильтрации (СКФ), определяемой по клиренсу эндогенного креатинина. Прирост СКФ 5% и более расценивался как сохраненный, а менее 5% или снижение СКФ — как истощенный резерв почек [6]. Концентрацию электролитов и ферментов в моче определяли унифицированным методом.

СС мочи исследовался по методу ЛКС, который основан на изменении спектральных характеристик монохроматического когерентного излучения гелий-неонового лазера (лазер газовый ЛГН-207А) в результате светорассеяния при прохождении через дисперсную систему [10, 14], для чего использовался лазерный корреляционный спектрометр, сопряженный с персональным компьютером типа IBM PC AT 486, 586. Исследования проводили после осаждения белка Тамм-Хорсфалла 0,58 М раствором NaCl [9]. В работе использовался оригинальный классификатор СС мочи для больных СД 2 типа по 5 информативным зонам (фракциям) в соответствии с их размерами: I — диаметр частиц от 0 до 5 нм, II — 5-15 нм, III — 15-50 нм, IV — 50-100 нм и V — свыше 100 нм. Условное соответствие фракций составу мочи представлено в табл. 1.

Таблица 1

Соответствие фракций мочи ее составу		
Фракции	Диаметр частиц, нм	Состав
I	0-5	Альбумины и другие низкомолекулярные белки
II	5-15	Альбумины, глобулины
III	15-50	Глобулины, высокомолекулярные липопротеины, низкомолекулярные иммунные комплексы
IV	50-100	Иммунные комплексы, липопротеины очень низкой плотности
V	>100	Крупномолекулярные комплексы, хиломикроны

Все клинические и лабораторные показатели, зарегистрированные у больных, были адаптированы для математической обработки и изучались с использованием вариационной статистики, корреляционного и регрессионного анализа с применением пакетов анализа Microsoft Excel 2002 и STATISTICA (версия 6.0).

Результаты

Среднее содержание частиц I фракции в контрольной группе составило 34,7% II – 4,4%, III – 8,9%, IV – 2,0%, V – 50,0% и практически не отличалось от спектра мочи больных СД 2 типа с нормоальбуминурией. СС мочи у больных СД с микроальбуминурией достоверно отличался от такового у пациентов с нормоальбуминурией и в контрольной группе по количеству частиц в I и IV фракциях, больных с протеинурией от исследуемого показателя во всех остальных обследованных группах по содержанию частиц I, III и IV фракций. Кроме того, количество частиц V фракции было достоверно меньше у больных с протеинурией по сравнению с пациентами с нормоальбуминурией. Также выявлено снижение количества частиц I фракции и увеличение процентного содержания IV фракции по мере нарастания альбуминурии (рис. 1).

У больных СД 2 типа с нормоальбуминурией СС мочи при нормальной СКФ отличался от такового у пациентов с гиперфилтрацией достоверно большим содержанием частиц I фракции при значимо



Рис. 1. СС мочи у больных СД 2 типа с различными стадиями ДН по данным ЛКС.
* Различия статистически значимы (p<0,05) по сравнению с контролем.

сниженном количестве частиц II и III фракций (табл. 2).

Схожие изменения СС состава мочи выявлены в группах пациентов с сохраненным и истощенным почечным функциональным резервом. Представляется, что выявленные отличия перспективны в диагностике более ранних доклинических стадий ДН на основе метода ЛКС.

При корреляционном анализе СС мочи с клинико-лабораторными показателями у больных СД 2 типа выявлена связь фракций мочи с показателями общего состояния организма, параметрами крови и мочи. При этом наиболее сильная корреляционная зависимость СС мочи была с уровнем альбуминурии (табл. 3).

Корреляционные взаимоотношения альбумина и СС мочи у больных СД 2 типа представлены на рис. 2-4.

В результате пошагового регрессионного анализа было получено уравнение, позволяющее рассчитывать концентрацию альбумина в моче исходя из значений СС мочи:

$$AY = -1,3xCCM1 + 8,3xCCM3 + 10,3xCCM4; p < 0,05,$$

где AY – альбуминурия; CCM1, CCM3, CCM4 – количество частиц I, III и IV фракций.

Из представленного уравнения видно, что концентрация альбумина в моче зависит от содержания частиц I, III и IV фракций.

Таблица 2

Показатель	Фракции мочи, %				
	I	II	III	IV	V
Величина СКФ норма, n=21 гиперфилтрация, n=24	33,2±3,8	5,9±1,8	4,4±1,2	2,7±1,0	53,9±3,8
	25,0±3,5*	10,7±2,4*	7,5±1,1*	2,4±0,5	54,4±3,5
Функциональный резерв сохранен, n=24 истощен, n=21	34,8±3,6	5,5±2,1	5,5±1,4	2,5±1,5	51,7±4,2
	24,0±4,7*	10,9±2,6*	8,1±1,2*	2,0±0,5	55,0±4,0

* Различия статистически значимы (p<0,05) внутри выделенных групп.

Таблица 3

Основные корреляционные связи СС мочи и клинко-лабораторных показателей у больных СД 2 типа					
Показатель	Коэффициенты корреляции (r) по фракциям мочи				
	I	II	III	IV	V
Больные СД 2 типа					
Белок крови	-0,05	0,32*	0,04	-0,17	-0,07
Триглицериды крови	-0,07	0,16	0,30*	0,12	-0,18
Креатинин крови	-0,23*	0,06	0,17	0,33*	-0,00
Альбумин мочи	-0,26*	0,06	0,36*	0,54*	-0,14
Белок мочи	-0,22*	0,06	0,30*	0,40*	-0,10
Больные СД 2 типа с нормоальбуминурией					
Белок крови	-0,06	0,34*	0,11	-0,14	-0,14
Триглицериды крови	-0,17	0,26	0,32*	-0,00	-0,07
Креатинин мочи	-0,28*	0,33*	0,12	0,08	0,04
Калий мочи	0,23	-0,10	0,32*	-0,02	-0,26*
Аланинаминотрансфераза мочи	-0,06	-0,19	-0,19	0,32*	0,15
СКФ	-0,02	0,30*	0,13	-0,14	-0,16
Больные СД 2 типа с микроальбуминурией					
Индекс массы тела	-0,38	0,08	-0,05	0,19	-0,50*
Глюкоза крови натощак	0,11	-0,50*	0,31	-0,24	0,20
Триглицериды крови	-0,58*	-0,27	0,12	0,04	-0,47
Креатинин крови	-0,36	-0,12	-0,19	-0,17	0,52*
Альбумин мочи	-0,36	0,45*	0,08	0,13	0,06
Белок мочи	-0,32	0,46*	-0,13	0,26	0,02
Больные СД 2 типа с протеинурией					
Длительность диабета	0,32	0,45	-0,93*	0,10	-0,02

* Коэффициенты корреляции статистически значимы ($p < 0,05$).

Заключение

Имеется настоятельная необходимость изучения перспективных методик исследований у больных СД, направленных на диагностику ранних, начальных изменений в разных органах и системах. Особую актуальность приобретает исследование приоритетных показателей мочи при возникновении и развитии ДН. Результаты, полученные с помощью ЛКС, показали, что СС мочи достоверно отличался у больных СД с различными стадиями ДН. При этом выявлено снижение процентного содержания частиц I фракции и увеличение III и IV фракции по мере нарастания

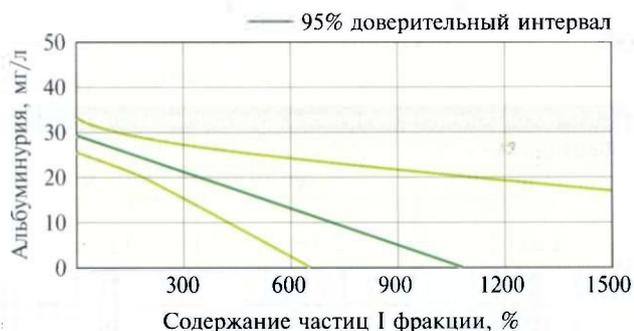


Рис. 2. Зависимость между содержанием частиц I фракции СС мочи и альбуминурией у больных СД 2 типа.



Рис. 3. Зависимость между содержанием частиц III фракции СС мочи и альбуминурией у больных СД 2 типа.



Рис. 4. Зависимость между содержанием частиц IV фракции СС мочи и альбуминурией у больных СД 2 типа.

альбуминурии. Выявленные закономерности между содержанием частиц I, III и IV фракций и альбуминурией являются, по-видимому, следствием как нивелирования несвязанных форм альбумина за счет нарастания процентного содержания крупномолекулярных белковых фракций, так и уменьшения их количества за счет увеличения содержания связанных форм альбумина в моче по мере утяжеления поражения почек.

Выявлены корреляционные связи СС мочи с различными показателями. Полученная связь показателя СС с уровнем триглицеридов крови говорит о влиянии липидного обмена на конечный состав мочи. Закономерны корреляции СС мочи с альбумин- и протеинурией, причем наиболее выражены они у больных с микроальбуминурией, у которых разброс концентрации белков мочи достаточно велик. Наибольший коэффициент корреляции между исследуемым показателем и длительностью СД был у больных с протеинурией. Представляется, что это связано с малым количеством наблюдений в данной группе пациентов.

У больных СД 2 типа с нормоальбуминурией СС мочи при нормальной СКФ отличался от такового у больных с гиперфилтрацией достоверно большим содержанием частиц I фракции при сниженном содержании частиц II и III фракций. Представляется, что выявленные отличия перспективны в диагностике более ранних доклинических стадий ДН на основе методики ЛКС.

Таким образом наши исследования показали, что у практически здоровых людей по результатам оценки СС мочи среднее содержание частиц I фракции составило – 34,7%; II – 4,4%; III – 8,9%; IV – 2,0%; V – 50,0%. С нарастанием альбуминурии у больных СД 2 типа достоверно уменьшилось содержание частиц I на фоне увеличения IV фракции. У пациентов с протеинурией значимо нарастало содержание частиц III фракции в отличие от контрольной группы и больных с нормо- и микроальбуминурией и снижалось содержание V фракции по сравнению с группой с нормоальбуминурией.

У пациентов с нормоальбуминурией выявлены достоверные отличия содержания частиц I, II и III фракций в группах с нормальными показателями клубочковой фильтрации и гиперфилтрацией, корреляционные взаимосвязи фракций мочи и концентрации белков, триглицеридов крови, креатинина, калия, аланинаминотрансферазы мочи и СКФ; с микроальбуминурией – индекса массы тела, концентрации глюкозы крови натощак, триглицеридов, креатинина крови, альбумина мочи; при наличии протеинурии – длительности СД.

Определение СС мочи может использоваться в клинической практике для обследования больных СД 2 типа на наличие ДН в качестве дополнительного и скринингового метода, направленного на выявление доклинических состояний и оценку эффективности сахароснижающей терапии.

Литература

1. Александрова Е.А., Нелаева Ю.В., Нелаева А.А., Шестакова М.В. // Сахарный диабет.- 2001.- № 3.- С. 12-16.
2. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремнистая В.М. // Consilium medicum.- 2000.- Т. 2, № 5.- С. 215-220.
3. Башарова Н.Г., Шапиро С.Б., Раков С.С., Долгов В.В. // Клин. лаб. диагностика.- 1994.- № 2.- С. 25-27.
4. Бокуняева Н.И. Моча // Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е.А. Кост.- М.: Медицина, 1975.- С. 217-245.
5. Дедов И.И., Сунцов Ю.И., Кудрякова С.В., Рыжкова С.Г. // Проблемы эндокринологии.- 1998.- № 3.- С. 45-49.
6. Дедов И.И., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия.- М.: Универсум Паблишинг.- 2000.- 240 с.
7. Ермолаева В.М., Филатова Н.Н., Джанашия П.Х. // Сахарный диабет.- 2001.- № 3.- С. 18-22.
8. Жук В.А. // Нефрология.- 1998.- Т. 2, № 3.- С. 67-70.
9. Лисовая Н.А. Информативность новых лабораторных технологий в диагностике заболеваний почек у детей: Автореф. ... дис. канд. мед. наук / СПб Гос. педиатрическая мед. акад.- СПб, 2001.- 27 с.
10. Носкин Л.А., Эмануэль В.Л., Федосеев Г.Б. и др. Лазерная корреляционная спектроскопия в диагностике бронхиальной астмы (пособие для врачей).- СПб: Издательство СПбГМУ, 2001.- 19 с.
11. Палагнюк В.Г. Разработка тест-системы рецепторно-ферментного анализа для определения микроальбуминурии: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук / Военно-медицинская академия.- СПб, 2001.- 20 с.
12. Шестакова М.В. // Сахарный диабет.- 2000.- № 1.- С. 15-18.
13. Шестакова М.В., Сунцов Ю.И., Дедов И.И. // Сахарный диабет.- 2001.- № 3.- С. 2-4.
14. Эмануэль В.Л., Генкин А.А., Носкин Л.А., Эмануэль Ю.В. // Лаб. медицина.- 2000.- № 3.- С. 7-12.
15. Cembrowski G.S. // Laboratory Medicine.- 1990.- Vol. 21.- P. 491-496.
16. Gonzalez M.T., Castell C., Esmatjes E. et al. // Rev. Clin. Esp.- 1999.- Vol. 199, № 1.- P. 8-12.
17. Hasslacher C. // Clin. Diag. Lab.- 1988.- Vol. 1.- P. 66-70.
18. Kleophas W., Voitz T., Messner H., Gries F.A. // Fortschr Med.- 1990.- Vol. 108, № 16.- P. 309-312.
19. Mogensen C.E., Schmitz O. // Medical Clinics of North America.- 1988.- Vol. 72.- P. 1465-1492.
20. World Health Organization. WHO expert committee on diabetes mellitus. 2-nd Report / Techn. Rep. Ser. 646.- Geneva.- 1980.- P. 1-80.