

616.379-008.64-053.5/67:616.633.1:577.15

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФЕРМЕНТУРИИ У ДЕТЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

Макеева Н.И., Цымбал В.Н.

Харьковский национальный медицинский университет

Обследовано 60 пациентов от 6 до 17 лет, страдающих сахарным диабетом 1-го типа с различной длительностью заболевания, и 20 практически здоровых детей группы контроля. Определяли уровни реноспецифических ферментов холинэстеразы, L-аланинаминопептидазы и б-глюкозидазы в моче. Установлено повышение уровня этих ферментов, что свидетельствует о нарушении функции гломерулярного и тубулярного аппаратов почек.

Ключевые слова: ферментурия, диабетическая нефропатия, дети.

Сахарный диабет (СД) по распространенности занимает 3-е место в мире среди неинфекционных болезней, уступая сердечнососудистым и онкологическим заболеваниям. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 347 миллионов людей во всем мире страдают этим сложным заболеванием. СД признан неинфекционной эпидемией XXI века [3]. Больных СД детей в мире становится больше на 70 тысяч ежегодно [5]. По прогнозам экспертов ВОЗ, в следующие 10 лет общее число случаев смерти из-за диабета возрастет вдвое, а к 2030 году диабет станет одной из ведущих причин смерти в мире. Сосудистые осложнения являются главной причиной смертности от СД. Одним из самых тяжелых осложнений СД является диабетическая нефропатия (ДН), которая входит в число основных причин почечной недостаточности. Фактическая распространенность ДН составляет от 20 до 38%, что в 2 раза превышает зарегистрированную [11]. По данным различных авторов, от 30 до 50% пациентов, заболевших СД в детском возрасте, умирают от почечной недостаточности [14,16]. Одним из наиболее информативных методов диагностики ДН является исследование уровня микроальбуминурии (МАУ). Постоянная МАУ, которая определяется трижды в течение 2-3 мес., свидетельствует о наличии у больного уже III стадии ДН, когда остановить прогрессирование процесса в сторону терминальной стадии ХПН возможно лишь у 50% больных [2,6]. Поэтому остается актуальным поиск ранних, специфических маркеров поражения почек при СД. По данным многих авторов, при СД в почках происходит повреждение канальцев и клубочков, что приводит к нарушению тубулярного и гломерулярного аппаратов почек, а в мочу последовательно выделяются ферменты с различной клеточной локализацией [8].

Таким образом, определение уровня ферментурии у детей с СД позволит определить уровень повреждения структурных элементов почек и своевременно назначить адекватную терапию.

Цель работы - совершенствование ранней диагностики ДН у детей, страдающих СД 1-го типа, путем исследования в моче активности реноспецифических ферментов.

Объект и методы исследования. Обследовано 60 детей (32 мальчика и 28 девочек), больных СД 1-го типа в возрасте от 6 до 17 лет. В зависимости от длительности заболевания пациенты разделены на группы: 1-я группа (n=10, средний возраст 14,64 ± 1,63 лет) с длительностью заболевания до 1 года, 2-я группа (n=25, средний возраст 12,09 ± 0,93 лет) с длительностью заболевания от 1 до 5 лет, 3-я группа (n=10, средний возраст 13,21 ± 0,89 лет) с длительностью СД более 5 лет и нормоальбуминурией, 4-я группа (n=15, средний возраст 15,46 ± 0,57 лет) с длительностью заболевания более 5 лет и ДН в стадии МАУ.

В группу контроля включены 20 практически здоровых детей аналогичного возраста, которые не имели жалоб, клинических признаков, анамнестических данных, которые бы свидетельствовали о наличии какого-либо хронического заболевания, а в течение последних двух месяцев - острых.

Пациенты были обследованы согласно протоколам диагностики и лечения детей, больных СД [12]. Определение уровня МАУ в суточной моче проводили путем осадка полиэтиленгликоля комплексом «антиген-антитело» методом конечной точки с помощью стандартного набора производства I.S.E.S.r.l. (Италия). Определение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) проводили расчетным путем по формуле Шварца.

Определение в моче уровня реноспецифичного фермента холинэстеразы (ХЭ), которая способна проникать через поврежденный гломерулярный фильтр [10], проводили кинетическим методом с использованием бутирилтиохолину с помощью коммерческого набора реагентов ООО НПП «Филисит-Диагностика» (Украина) на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 405 нм. Для оценки повреждения тубулярного аппарата исследовали активность ферментов нейтральной б-глюкозидазы (б-НД) и L-аланинаминопептидазы (L-AP). Активность б-НД (КФ 3.2.1.20; фермент щеточной каймы эпителия канальцев) измеряли по скорости образования глюкозы из мальтозы и выражали в мкмоль мальтозы, распавшейся за 1 час. Активность L-AP (КФ 3.4.1.2; лизосомальный фермент) определяли кинетическим фотометрическим методом с использованием реактивов «Сигма» (США). Активность всех ферментов была отнесена к 1 ммоль креатинина мочи. Исследования проводились на программируемом фотометре «Стат-ФАКС» (США), спектрофотометре «СФ-2000 Био» (Россия).

Статистический анализ проводили с помощью статистических пакетов «EXCELL FOR WINDOWS» и «STATISTICA 7.0. FOR WINDOWS». В качестве характеристики группы для признаков с распределением, соответствующим закону Гаусса, определяли среднее арифметическое значение (\bar{x}), его ошибку (S) и стандартное отклонение (S). Для выборок с распределением, отличным от нормального определяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Lq – нижний квартиль; Uq – верхний квартиль). При сравнении показателей, которые характеризовались сравнением более 2 точек, использовали Н критерий дисперсионного анализа Краскла-Уоллиса (KW). За уровень значимости принимали $p < 0,05$. Для сравнения двух выборок использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни (MW), а различия считали достоверными с учетом поправки Бонферрони. Оценку связи между рядами показателей определяли с помощью метода ранговой корреляции Спирмана (r).

Результаты и их обсуждение. У детей всех групп установлено наличие длительной гипергликемии, что подтверждает высокий уровень гликозилированного гемоглобина (HbA1c) без групповых различий (все $p < 0,05$) (табл. 1).

У 20% пациентов 1-й группы (СКФ – $136 \pm 3,9$ мл/мин) и 32% больных 2-й группы (СКФ – $143 \pm 4,75$ мл/мин) наблюдалась тенденция к гиперфильтрации. У 30% пациентов 3-й группы и у 40% больных 4-й группы зафиксировано снижение СКФ ($88 \pm 3,4$ мл/мин и $85 \pm 4,8$ мл/мин соответственно). Это, очевидно, связано с истощением физиологических компенсаторных механизмов и прогрессированием ДН.

Результаты показателей активности ферментов мочи у детей больных СД 1-го типа представлены в таблице 2.

Таблица 1 - Статистические характеристики некоторых показателей течения СД

Показатель	Стат. показатели	Дети, больные СД 1-го типа			
		1-я гр. (n=10)	2-я гр. (n=25)	3-я гр. (n=10)	4-я гр. (n=15)
HbA1c, %	Me	11,86	11,41	12,28	12,65
	Lq	8,13	8,9	10,45	9,98
	Uq	14,41	14,4	13,32	13,82
СКФ, мл/мин	Me	128	122	104	106
	Lq	124	108	69	77
	Uq	136	138	124	117
МАУ, мг/сут	Me	8,6	12,3	11,9	46,8
	Lq	6,0	6,2	7,0	35,6
	Uq	10,9	20,4	19,7	57,4

Таблица 2 - Статистические характеристики показателей ферментов в моче

Показатель	Стат. показатели	Дети, больные СД 1-го типа				Контроль (n=20)
		1-я гр. (n=10)	2-я гр. (n=25)	3-я гр. (n=10)	4-я гр. (n=15)	
ХЭ, Ед/мг креатин	Me	5,75*	8,30*	6,45*	7,5*	2,97
	Lq	5,50	8,15	6,20	7,15	2,89
	Uq	6,12	8,54	6,70	7,65	3,10
α-HD, мU/мл	Me	9,82	16,32*	10,35*	9,12	7,05
	Lq	9,73	15,92	9,94	8,72	6,55
	Uq	10,15	16,64	10,51	9,31	7,97
L-AP, нкат/ммоль креатина	Me	5,8*	6,5*	6,4*	5,9*	4,8
	Lq	5,5	6,4	6,3	5,7	4,5
	Uq	6,2	6,8	6,8	6,1	5,1

Примечание. * - $p < 0,05$ при сравнении с показателями группы контроля.

После проведенного множественного сравнения статистических характеристик показателей ферментурии отметим, что критерий Краскла-Уоллиса (H) по всем параметрам высоко значимый (таблица 3). Это дает право утверждать, что статистические характеристики соответствующих показателей различных групп значимо отличаются между собой, а уровень лабораторных показателей, которые исследовались, зависит от принадлежности пациента к той или иной группе.

Исследование содержания ХЭ в моче определило статистически значимое повышение его уровня, по сравнению с контролем, у детей всех групп (соответственно, $p_{k-1} = 0,0001$, $p_{k-2} = 0,0000$, $p_{k-3} = 0,0000$, $p_{k-4} = 0,0000$). При попарном сравнении определены достоверные различия между соответствующими показателями детей всех групп (см. таблицу. 3). По степени отклонения от нормативных показателей уровни ХЭ распределились следующим образом: наивысшее отклонение установлено у детей 2-й группы ($t=71,99$), второе ранговое место занял уровень ХЭ у больных 4-й группы ($t = 49,65$), на третьем месте по степени отклонения находится показатель ХЭ у пациен-

Таблица 2 - Статистические характеристики множественного и парного сравнения активности ферментурии обследованных детей с ДН

Критерии сравнения и уровни их значимости		ХЭ	L-AP	α-HD
KW	H	66,58419	54,39451	62,8271
	p	0,0000	0,0000	0,0000
MW	p*	$p_{1-2} = 0,0000$	$p_{1-2} = 0,0003$	$p_{1-2} = 0,0000$
		$p_{1-3} = 0,0012$	$p_{1-3} = 0,007$	$p_{1-3} = 0,0000$
		$p_{1-4} = 0,0003$	$p_{1-4} = 0,4053$	$p_{1-4} = 0,0005$
		$p_{2-3} = 0,0000$	$p_{2-3} = 0,4449$	$p_{2-3} = 0,031$
		$p_{2-4} = 0,0019$	$p_{2-4} = 0,0000$	$p_{2-4} = 0,0000$
		$p_{3-4} = 0,0000$	$p_{3-4} = 0,0019$	$p_{3-4} = 0,0000$

Примечание. * - согласно поправке Бонферрони достоверность различий при $p < 0,0125$.

тов 3-й группы ($t = 43,75$). Наименьшее отклонение, но статистически значимое, зафиксировано у пациентов 1-й группы ($t = 36,42$). Принимая во внимание результаты экспериментальных и клинических исследований, доказывающих, что повышенный уровень ХЭ в моче возможен при несостоятельности гломерулярного фильтра [4,9], так называемом, синдроме повышенной клубочковой проницаемости, можно предположить, что нарушения гломерулярного фильтра у больных с СД 1-го типа регистрируются уже на первом году заболевания. С ростом продолжительности СД увеличивается и уровень проницаемости гломерулярного фильтра, что подтверждено корреляционной связью между длительностью СД и уровнем ХЭ у детей 1-й и 2-й групп ($r = +0,59$; $p < 0,01$). Существенное, длительное нарушение целостности гломерулярного фильтра в дальнейшем сопровождается развитием МАУ, что наглядно подтверждено интеркорреляционной между уровнем ХЭ и МАУ ($r = +0,54$; $p < 0,05$) у больных 4-й группы.

При исследовании уровня б-HD определено статистически значимое повышение этого показателя у больных всех групп по сравнению с группой контроля (соответственно, $p_{k-1} = 0,0006$, $p_{k-2} = 0,0000$, $p_{k-3} = 0,0000$, $p_{k-4} = 0,0006$). При попарном сравнении не определены достоверные различия между показателями ферментурии пациентов 2-й и 3-й группы. Распределение уровней б-HD по степени отклонения от нормативных показателей: наивысшее отклонение установлено у детей 2-й группы ($t = 20,26$), второе ранговое место занял уровень б-HD у больных 3-й группы ($t = 4,92$), на третьем месте по степени отклонения находится показатель б-HD у пациентов 4-й группы ($t = 3,58$). Наименьшее отклонение, но статистически значимое, зафиксировано у пациентов 1-й группы ($t = 3,65$). Поскольку б-HD мочи имеет исключительно почечное происхождение и свидетельствует о повреждении почечной ткани [1], повышение ее активности у пациентов с СД 1-го типа, в первую очередь, свидетельствует о вовлечении в патологический процесс канальцев нефрона. Наименьшее отклонение уровня б-HD мочи у детей 1-й группы может свидетельствовать о компенсаторном сохранении структурно-функционального состояния эпителия канальцев. А снижение активности б-HD у детей 4-й группы скорее всего обусловлено нарушением канальцевого аппарата с формированием склероза [15]. Многими авторами доказано, что экскреция всех ферментов с мочой снижается с прогрессированием ХПН [7,13,14].

Уровни лизосомального фермента L-AP, по сравнению с контролем, у пациентов всех групп были достоверно выше (соответственно $p_{k-1} = 0,0009$, $p_{k-2} = 0,0000$,

$p_{k-3} = 0,0000$, $p_{k-4} = 0,0000$). При попарном сравнении не выявлено достоверных различий между показателями ферментурии больных 1-й и 4-й группы, а также 2-й и 3-й группы. По степени отклонения от нормативных показателей уровни L-AP распределились следующим образом: наивысшее отклонение установлено у детей 2-й группы ($t = 17,2$), второе ранговое место занял уровень L-AP у больных 3-й группы ($t = 11,52$), на третьем месте по степени отклонения находится показатель L-AP у пациентов 4-й группы ($t = 9,93$). Наименьшее отклонение, но статистически значимое, зафиксировано у пациентов 1-й группы ($t = 5,4$).

Повышение активности лизосомального фермента L-AP в моче позволяет диагностировать нарушение целостности тубулярного аппарата и свидетельствует о глубоком повреждении эпителия проксимальных канальцев почек [1] среди обследованных детей с СД 1-го типа.

Таким образом, проведенное исследование показало, что гломерулярная и канальцевая дисфункции наблюдаются уже на первом году заболевания, выраженность нарушений нарастает по мере продолжительности болезни. Определение в моче уровней органоспецифических почечных ферментов с различной клеточной локализацией можно использовать для уточнения топике поражения почек, а также для ранней диагностики ДН у детей, страдающих СД 1-го типа.

Заключение. Учитывая то, что формирование и прогрессирование ДН происходит до появления явных клинических признаков и МАУ, поиск ранних маркеров повреждения тубулярного и гломерулярного аппаратов почек остается актуальным. Также целесообразным считаем изучение показателей обмена соединительной ткани почек, что даст возможность на ранних этапах определить формирование по анализам мочи нефросклероза и разработать средства адекватной ренопротекции.

Литература

1. Белова М.А. Диагностика функционального состояния и степени повреждения почечных канальцев I типа у детей, больных сахарным диабетом I типа: дис. канд. мед наук: 14.00.09 /

М.А. Белова. – Оренбург, 2008. – 137 с.

2. Дедов И.И. Диабетическая нефропатия / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. – М. Универсум паблишинг, 2000. – 240 с.

3. Информационный бюллетень ВОЗ №312, сентябрь 2012 г.

4. Рослый И.М. Гипотеза: адаптивное значение ферментурии / И.М. Рослый, С.В. Абрамов. – Пат. физ. и экспер. терапия – 2003. – №4. – С. 5–9.

5. Сенаторова А.С. Сахарный диабет от ребенка до взрослого / А.С. Сенаторова, Ю.И. Караченцев и др. – Монография. – Харьков: Изд-во ХНМУ, 2009. – С. 94-96.

6. Хирманов В.Н. Факторы риска: микроальбуминурия / В.Н. Хирманов. – Тер. архив. – 2004. – №9. – С.78-84.

7. Цыганенко А.Я. Клиническая биохимия / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, И.В. Завгородний. – Москва. «Три-ада-Х». — 2002. 504 с.

8. Шулуток Б.И. Нефрология-2002. Современное состояние проблемы / Б.И. Шулуток. – СПб.: Ренкор, 2002. – 780 с.

9. Юрьева Э.А. Диагностический справочник нефролога / Э.А. Юрьева, В.В. Длин – М.: Оверлей, 2002. – 96 с.

10. Дриль І.С. Маркери пошкодження ниркових канальців у дітей із хронічним захворюванням нирок: дис. канд. мед. наук: 14.01.10 / І.С. Дриль – Харків, 2011. – 141 с.

11. Иванов Д.Д. Нефрологія в практиці сімейного лікаря / Д.Д. Иванов, О.М. Корж. – Навч.-метод. посібник. — 2-ге вид., переробл. — Донецьк: Видавель Заславський О.Ю., 2012. — 384 с.

12. Про затвердження протоколів надання медичної допомоги дітям за спеціальністю “Дитяча ендокринологія”: протокол надання медичної допомоги дітям хворим на цукровий діабет. Наказу МОЗ України № 254 від 27.04.2006.

13. John Chan. Diabetic Nephropathy / Chan John. – InTech, Published: April 20, 2012. – P. – 3-5.

14. Kanwar Y.S., Wada J., Sun L. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression / Y.S. Kanwar, J. Wada, L. Sun [et al.]. – E. Biol. Med. (Maywood). – 2008. – Vol. 233(1). – P. 4–11.

15. Mezzano S. Angiotensin II and Renal Fibrosis / S. Mezzano, M. Ruiz-Ortega, J. Egido. – Hypertension. – 2001. – Vol. 38. – P. 635-640.

16. Nephropathy in Diabetes (American Diabetes Association) / Diabetes Care. – 2004. – Vol.1. – P. 79–83.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF ENZYMEURIA IN CHILDREN WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1

Makeyeva N.I., Tsymbal V.N.

Kharkov National Medical University

60 children suffering from diabetes mellitus type 1 with various duration of the disease and 20 healthy children from the control group have been examined. Levels of renospecific enzymes such as cholinesterase, L-alanine aminopeptidase and δ -glucosidase in urine were estimated. The increased levels of these enzymes indicating disorders of the glomerular and tubular kidney apparatus were found.

Key words: *enzymuria, diabetic nephropathy, children.*

Адрес для корреспонденции: e-mail: makeevanataly@rambler.ru

Поступила 29.08.2013