

## ВИТАМИН D-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК В РОЛИ МАРКЕРА ТУБУЛОИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК У ДЕТЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

Макеева Н.И., Цымбал В.Н.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

*С целью поиска специфических маркеров повреждений почек обследовано 42 пациента в возрасте от 6 до 17 лет страдающих сахарным диабетом 1-го типа. Определяли в моче уровни витамин D-связывающего белка (VDBP), L-аланинаминопептидазы (L-AP) и  $\beta$ -2-микроглобулина ( $\beta$ -2-МГ). Определено статистически значимое повышение уровней VDBP, L-AP и  $\beta$ -2-МГ в моче у обследуемых пациентов. Определение экскреции VDBP с мочой может использоваться в качестве маркера тубулоинтерстициального повреждения почек у детей с сахарным диабетом.*

**Ключевые слова:** витамин D-связывающий белок, сахарный диабет, диабетическая нефропатия, дети.

Диабетическая нефропатия (ДН) является одной из наиболее частых причин развития нефросклероза, приводящего к развитию хронической почечной недостаточности (ХПН) и смерти пациентов трудоспособного возраста. По потребности в лечении гемодиализом и трансплантации почек пациенты с сахарным диабетом (СД) прочно удерживают лидерство в развитых странах [2]. По данным Международной Диабетической Федерации, ежегодно около 500 тысяч новых пациентов с СД нуждаются в проведении гемодиализа [13]. Несмотря на интенсивные исследования, проблема ранней диагностики ДН, особенно ее допротейнурических стадий, не утратила до сегодняшнего дня своей остроты и актуальности. Учеными доказано, что повреждение тубулярного аппарата происходит на ранних этапах развития ДН, ещё до появления явных клинических признаков [5]. Экспериментальные и немногочисленные клинические исследования показывают, что при тубулоинтерстициальных повреждениях в мочу выделяются ферменты с различной клеточной локализацией, белки, а также другие биологически активные вещества [11]. Наиболее высокое повышение экскреции ферментов определяется у детей с продолжительным течением сахарного диабета, но поражение почек происходит уже на первом году заболевания [4]. Проведенные собственные исследования показывают, что при СД повышается активность лизосомального фермента L-аланинаминопептидазы (L-AP) в моче [3]. Повышенная экскреция с мочой L-AP подтверждает нарушение целостности тубулярного аппарата и свидетельствует о глубоком повреждении эпителия проксимальных канальцев почек при ДН [1].

Одним из показателей, по которому может оцениваться тубулярная функция почек, является экскреция с мочой  $\beta$ -2-микроглобулина ( $\beta$ -2-МГ) [12]. В норме этот низкомолекулярный протеин полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах почек. Поэтому по экскреции с мочой  $\beta$ -2-МГ оценивают реабсорбционную функцию проксимальных канальцев [6]. Патологический фактор прежде всего повреждает наиболее активные участки нефронов – проксимальный отдел почечного канальца [8]. Поэтому по уровню показателей, отражающих функциональное состояние проксимального отдела почечных канальцев, можно прогнозировать развитие ДН, наблюдать за ходом болезни и динамикой прогрессирования патологического процесса в почках. Известно, что повышенная экскреция  $\beta$ -2-МГ позволяет выявить почечную патологию на ранних этапах ее развития [7].

Продолжается поиск специфических маркеров

повреждений почек на ранних этапах формирования ДН. В этом направлении перспективным считается определение уровня витамин D-связывающего белка (VDBP), также известного как  $\alpha$ 2-глобулин, который относится к классу  $\alpha$ 2-глобулинов [9]. Основной функцией VDBP является транспорт кальциферола и витамина D по всему организму [10]. Он также играет важную роль в иммунных реакциях и воспалительном процессе. Преобладающее количество витамина D в крови циркулирует в связанном с VDBP состоянии. VDBP фильтруется в клубочках и впоследствии поглощается клетками проксимальных канальцев с помощью рецептор-опосредованного механизма [14]. У детей, страдающих СД 1-го типа формирование ДН связано с тубулоинтерстициальным повреждением почек, что может привести к повышенной экскреции VDBP с мочой (uVDBP) [15].

Кроме того, при прогрессировании ДН имеет место нарушение клубочковой фильтрации, что также может способствовать увеличению экскреции VDBP с мочой [16]. Учитывая повреждения канальцевого аппарата при ДН, определение экскреции uVDBP может стать новым биомаркером тубулоинтерстициальных повреждений при СД.

Цель работы: провести сравнительный анализ уровней экскреции с мочой L-AP,  $\beta$ -2-МГ и uVDBP у детей с СД 1-го типа.

Пациенты и методы: Обследовано 42 ребенка (22 мальчика и 20 девочек), пациентов СД 1-го типа, в возрасте от 6 до 17 лет. Дети были разделены на группы согласно длительности СД и наличия МАУ, экскреция которой подтверждена троекратным измерением в суточной моче: 1-я группа (n=24, средний возраст 14,64±1,63 лет) с длительностью сахарного диабета более 5 лет и нормоальбуминурией, 2-я группа (n=18, средний возраст 12,09±0,93 лет) пациенты с длительностью СД более 5 лет и ДН в стадии микроальбуминурии (МАУ). В группу контроля включены 15 практически здоровых детей аналогичного возраста, которые не имели жалоб, клинических признаков, анамнестических данных, свидетельствующих о наличии какого-либо хронического заболевания и в течение последних двух месяцев острых заболеваний. Пациенты были обследованы согласно протоколам диагностики и лечения детей, больных СД. Определяли уровни гликозилированного гемоглобина (HbA1c), МАУ, креатинина и мочевины крови, скорости клубочковой фильтрации (СКФ), uVDBP,  $\beta$ -2-МГ и L-AP. 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 СКФ проводили расчетным путем по формуле Шварца. Уровень VDBP определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора реагентов «Vitamin D binding protein, ELISA», (кат. №2314), фирмы «Immundiagnostik» (Германия), в соответствии с инструкциями изготовителя на иммуноферментном анализаторе «LabLine-90» (Австрия).

Активность L-AP (КФ 3.4.1.2; лизосомальный фермент) определяли кинетическим фотометрическим методом с использованием реактивов «Сигма» (США). Активность фермента была отнесена к 1 ммоль креатинина мочи. Исследования проводились на программируемом фотометре «Стат-ФАКС» (США), спектрофотометре «СФ-46» (Россия). Уровень  $\beta$ -2-МГ определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA с помощью набора «ORG 5BM» фирмы «ORGENTEC GmbH» (Германия) согласно инструкциям изготовителя на иммуноферментном анализаторе «LabLine-90» (Австрия).

Статистический анализ проводили с помощью статистических пакетов "EXCELL FOR WINDOWS" и "STATISTICA 8.0. FOR WINDOWS". Для выборок с распределением, отличным от нормального, определяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Lq – нижний квартиль; Uq – верхний квартиль). Для сравнения двух выборок использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни (MW). При сравнении показателей, которые характеризовались сравнением более 2 точек, использовали N критерий дисперсионного анализа Краскла-Уоллиса (KW), а различия считали достоверными с учетом поправки Бонферрони. Оценку связи между рядами показателей определяли с помощью метода ранговой корреляции Спирмана (r). Для построения функциональной зависимости между числовыми переменными использовали процедуру множественного регрессивного анализа с пошаговым удалением незначимых переменных с последующей оценкой коэффициента множественной корреляции (R) и коэффициента детерминации (R<sup>2</sup>).

Клиническое исследование было одобрено Комиссией по вопросам этики и биоэтики Харьковского национального медицинского университета. Все участники и их родители дали письменное информированное согласие.

### Результаты и обсуждение

У детей из всех групп установлено наличие длительной гипергликемии, что подтверждает высокий уровень HbA<sub>1c</sub>, без групповых различий (все  $p > 0,05$ ) (табл. 1). При обследовании установлено, что у 33%

**Таблица 1.** - Статистические характеристики некоторых показателей течения СД

Показатель	Статистические показатели	Дети, больные СД 1-го типа		P
		1-я гр. (n=24)	2-я гр. (n=18)	
HbA <sub>1c</sub> , %	Me	8,28	8,65	p <sub>1-2</sub> =0,6329
	Lq	7,45	7,98	
	Uq	9,32	9,82	
СКФ, мл/мин	Me	104	106	p <sub>1-2</sub> =0,1101
	Lq	69	77	
	Uq	124	117	
МАУ, мг/сут	Me	11,9	46,8	p <sub>1-2</sub> =0,0000
	Lq	7,0	55,6	
	Uq	19,7	77,4	

пациентов 1-й группы и у 44% пациентов во 2-й группе имеет место снижение СКФ (104 (69; 124) и 106 (77; 117) мл/мин соответственно). При исследовании МАУ определено статистически значимое повышение этого показателя у детей 2-й группы по сравнению с 1-й группой пациентов (46,8 (55,6; 77,4) и 11,9 (7,0; 19,7) мг/сут, соответственно ( $p < 0,001$ )).

Уровни лизосомального фермента L-AP, по сравнению с контролем, у пациентов всех групп были достоверно выше (все  $p < 0,001$ ).

У детей, больных СД 1-го типа, зафиксировано достоверное повышение ( $p = 0,000211$ ) экскреции  $\beta$ -2-МГ в моче по сравнению с группой контроля.

При исследовании уровня uVDBP мочи определено статистически значимое повышение данного показателя у пациентов 1-й и 2-й групп (179,5 (174,0; 189,0) и 219,0 (216,0; 222,0) мкг/л, соответственно, в сравнении с контрольной группой 125,0 (116,5; 136,0) мкг/л ( $p < 0,001$ )).

При проведении дисперсионного анализа Краскла-Уоллиса статистических характеристик уровней показателей VDBP,  $\beta$ -2-МГ, L-AP установлено, что критерий N по всем параметрам высоко значимый (VDBP-N=27,5;  $p = 0,0000$ ). Это дает право утверждать, что статистические характеристики соответствующих показателей разных групп достоверно отличаются друг от друга, а уровень этих параметров зависит от принадлежности к той или иной группе, т.е. от наличия или отсутствия МАУ.

**Таблица 2.** - Статистические характеристики показателей uVDBP,  $\beta$ -2-МГ, L-AP у детей с СД 1-го типа

Показатель	Статистические показатели	Дети, больные СД 1-го типа		Контроль (n=15)	P
		1-я гр.	2-я гр.		
VDBP мкг/л	Me	179,5	219,0	125,0	p <sub>1-2</sub> =0,0000 p <sub>k-1</sub> =0,0000 p <sub>k-2</sub> =0,0000
	Lq	174,0	216,0	116,5	
	Uq	189,0	222,0	136,0	
$\beta$ -2-МГ мкг/мл	Me	1,62	1,74	0,36	p <sub>1-2</sub> =0,263 p <sub>k-1</sub> =0,0000 p <sub>k-2</sub> =0,0000
	Lq	1,16	0,94	0,22	
	Uq	2,63	2,92	0,41	
L-AP нкат/1ммоль креатинина	Me	6,4	5,9	4,8	p <sub>1-2</sub> =0,0000 p <sub>k-1</sub> =0,0000 p <sub>k-2</sub> =0,0000
	Lq	6,3	5,7	4,5	
	Uq	6,8	6,1	5,1	

При попарном сравнении установлено, что уровни VDBP достоверно выше у пациентов 1-й и 2-й групп по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,001$ ). Проведенное исследование показало, что показатели экскреции uVDBP были значительно выше у пациентов с МАУ по сравнению со страдающими сахарным диабетом и нормоальбинурией ( $p < 0,001$ ). Таким образом, повышение экскреции uVDBP растет с прогрессированием тяжести тубулоинтерстициального повреждения почек при СД.

В результате проведения множественного регрессивного анализа установлены высокие уровни коэффициента множественной корреляции (R=0,81) и коэффициента детерминации (R<sup>2</sup>=0,72), что позволяет думать о наличии «тесной» связи уровня VDBP с показателями МАУ ( $p = 0,004$ ), гликозилированной гемоглобина ( $p = 0,010$ ),  $\beta$ -2-МГ ( $p = 0,007$ ) и LAP ( $p = 0,037$ ).

### Выводы

Проведенное исследование определило повышение уровня экскреции VDBP с мочой у детей на ранних стадиях развития ДН. Сравнительная характеристика между маркерами по-

вреждения тубулярного аппарата L-AP,  $\beta$ -2-МГ и экскрецией VDBP с мочой установила позитивные корреляционные связи между этими показателями.

Повышение уровня экскреции с мочой витамин Д-связывающего белка происходит на ранних этапах развития ДН, ещё до появления явных клинических признаков и МАУ. Принимая во внимание,

### Литература

1. Белова М.А. Особенности функционального состояния канальцевого аппарата почек у детей с сахарным диабетом типа 1 / М.А. Белова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2006. – №6, т.2. – С.155-159.
2. Иванов Д.Д. Диабетическая болезнь почек / Д.Д. Иванов // Клиническая практика. – 2008. – №3 (24). – С. 86-88.
3. Макеева Н.И., Цымбал В.Н. Клиническое значение ферментурии у детей с сахарным диабетом 1-го типа / Н.И. Макеева, В.Н. Цымбал // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – №3 (43). – С. 30-34.
4. Сенаторова А.С., Муратова Е.Г. Диагностическая ценность цистатина в моче у детей с сахарным диабетом 1-го типа как раннего маркера диабетической нефропатии / А.С. Сенаторова, Е.Г. Муратова // Казанский медицинский журнал. – 2013. – №2. – С. 186-189.
5. Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия: вопросы обратимости / М.В. Шестакова // Consilium Medicum. – 2011. – №12. – С. 23-26.
6. Araki S. Novel biomarkers for diabetic nephropathy / S. Araki // Japanese journal of clinical pathology. – 2014. – Vol. 62 (2). – P. 171-179.
7. Beta-2 microglobulin levels in hemodialysis patients // Mumtaz A, Anees M, Bilal M et al. // Saudi J Kidney Dis Transpl. – 2010. – Vol. 21 (4). – P. 701-706.
8. Blantz R., Singh P. Glomerular and Tubular Function in the Diabetic Kidney / R. Blantz, P. Singh // Adv Chronic Kidney Dis. – 2014. – Vol. 21 (3). – P. 297-303.
9. Elevated urinary level of vitamin D-binding protein as a novel biomarker for diabetic nephropathy / Tian XQ, Zhao LM, Ge JP [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2014. – Vol. 7 (2). – P. 411-416.
10. Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: a role in vitamin D deficiency? / Thrailkill KM, Cockrell GE, Moreau CS [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2011. – Vol. 96 (1). – P. 142-149.
11. Kanwar Y.S., Wada J., Sun L. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression / Y.S. Kanwar, J. Wada, L. Sun // E. Biol. Med. – 2008. – Vol. 233 (1). – P. 4-11.
12. Clinical utility of serum beta-2-microglobulin as a predictor of diabetic complications in patients with type 2 diabetes without renal impairment / Kim MK, Yun KJ [et al.] // Diabet. Metab. – 2014. – Vol. 40 (6). – P. 459-465.
13. Park CW. Diabetic kidney disease: from epidemiology to clinical perspectives / CW. Park // Diabetes Metab. J. – 2014. – Vol. 38 (4). – P. 252-260.
14. Reduced serum vitamin D-binding protein levels are associated with type 1 diabetes / Blanton D, Han Z, Bierschenk L. [et al.] // Diabetes. – 2011. – Vol. 60 (10). – P. 2566-2570.
15. Vitamin D receptor and its protective role in diabetic nephropathy / Guan X, Yang H, Zhang W [et al.] // Chin. Med. J. – 2014. – Vol. 127 (2). – P. 365-369.
16. Vitamin D status in children with Type 1 diabetes / N. Makieieva, V. Tsymbal [et al.] // International peer-reviewed journal "Arch Dis Child". – 2014. – Vol. 99. – P. 271-272. doi:10.1136/archdischild-2014-307384.737.

что этот метод неинвазивный, практически не зависит от пола, возраста, состояния пациента, его можно использовать как скрининг-тест для идентификации повреждения канальцевого аппарата почек. Определение экскреции VDBP с мочой может использоваться в качестве нового биомаркера тубулоинтерстициального поражения почек у детей с ДН.

### Literatura

1. Belova M.A. Osobennosti funktsionalnogo sostoyaniya kanal'tsevoogo apparata pochek u detey s saharnym diabetom tipa 1 / M.A. Belova // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. – 2006. – № 6, t.2. – S.155-159.
2. Ivanov D.D. Diabeticheskaya bolezнь pochek / D.D. Ivanov // Klinicheskaya praktika. – 2008. – №3 (24). – S. 86-88.
3. Makeeva N.I., Tsyimbal V.N. Klinicheskoe znachenie fermenturii u detey s saharnym diabetom 1-go tipa / N.I. Makeeva, V.N. Tsyimbal // Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. – 2013. – #3 (43). – S. 30-34.
4. Senatorova A.S., Muratova E.G. Diagnosticheskaya tsennost tsistatina s v moche u detey s saharnym diabetom 1-go tipa kak rannego markera diabeticheskoy nefropatii / A.S. Senatorova, E.G. Muratova // Kazanskiy meditsinskiy zhurnal. – 2013. – №2. – S. 186-189.
5. Shestakova M.V. Diabeticheskaya nefropatiya: voprosy obratimosti / M.V. Shestakova // Consilium Medicum. – 2011. – №12. – S. 23-26.
6. Araki S. Novel biomarkers for diabetic nephropathy / S. Araki // Japanese journal of clinical pathology. – 2014. – Vol. 62 (2). – P. 171-179.
7. Beta-2 microglobulin levels in hemodialysis patients // Mumtaz A, Anees M, Bilal M et al. // Saudi J Kidney Dis Transpl. – 2010. – Vol. 21 (4). – P. 701-706.
8. Blantz R., Singh P. Glomerular and Tubular Function in the Diabetic Kidney / R. Blantz, P. Singh // Adv Chronic Kidney Dis. – 2014. – Vol. 21 (3). – P. 297-303.
9. Elevated urinary level of vitamin D-binding protein as a novel biomarker for diabetic nephropathy / Tian XQ, Zhao LM, Ge JP [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2014. – Vol. 7 (2). – P. 411-416.
10. Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: a role in vitamin D deficiency? / Thrailkill KM, Cockrell GE, Moreau CS [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2011. – Vol. 96 (1). – P. 142-149.
11. Kanwar Y.S., Wada J., Sun L. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression / Y.S. Kanwar, J. Wada, L. Sun // E. Biol. Med. – 2008. – Vol. 233 (1). – P. 4-11.
12. Clinical utility of serum beta-2-microglobulin as a predictor of diabetic complications in patients with type 2 diabetes without renal impairment / Kim MK, Yun KJ, Chun HJ [et al.] // Diabetes Metab. – 2014. – Vol. 40 (6). – P. 459-465.
13. Park CW. Diabetic kidney disease: from epidemiology to clinical perspectives / CW. Park // Diabetes Metab. J. – 2014. – Vol. 38 (4). – P. 252-260.
14. Reduced serum vitamin D-binding protein levels are associated with type 1 diabetes / Blanton D, Han Z, Bierschenk L. [et al.] // Diabetes. – 2011. – Vol. 60 (10). – P. 2566-2570.
15. Vitamin D receptor and its protective role in diabetic nephropathy / Guan X, Yang H, Zhang W [et al.] // Chin. Med. J. – 2014. – Vol. 127 (2). – P. 365-369.
16. Vitamin D status in children with Type 1 diabetes / N. Makieieva, V. Tsymbal [et al.] // International peer-reviewed journal "Arch Dis Child". – 2014. – Vol. 99. – P. 271-272. doi:10.1136/archdischild-2014-307384.737.

**VITAMIN D-BINDING PROTEIN AS MARKER OF KIDNEY TUBULOINTERSTITIAL DAMAGE IN CHILDREN WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1***Makieieva N.I., Tsymbal V.N.*

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

---

*42 patients aged 6 to 17 years old suffering from type 1 diabetes (T1D) were examined. Urine levels of vitamin D-binding protein (VDBP), L-Alanine aminopeptidase (L-AP) and  $\beta$ -2 microglobulin ( $\beta$ 2-MG) were determined. Urine VDBP, L-AP and  $\beta$ 2-MG levels were elevated in the patients with T1D, compared with controls ( $p < 0.001$ ). Determination of urinary excretion of VDBP can be used as a marker of kidney tubulointerstitial damage in children with T1D.*

**Key words:** *vitamin D-binding protein, diabetes mellitus, diabetic nephropathy, children.*

---

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

*Поступила 19.05.2015*