

8. Gilmiyarova F., Kolotyeva N., Radomskaya V., Gussyakova O., Gorbacheva I., Potekhina V. Role of the Metabolic Minor Components in the Regulation of Intermolecular Interaction. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2016. № 4. P. 28-35. doi: 10.4236/jbm.2016.47004.

9. Gylmiyarova F.N., Radomskaya V.M., Gussyakova O.A. et al. The effect of Pyruvate on Antibody Interaction with Group-Specific Erythrocyte Antigens. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*. 2014. Vol. 8. P. 260-265. doi:10.1134/S1990750814030056.

10. Гильмиярова Ф.Н. Антигены ABO системы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 8. С. 21-27.

Gil'miiaarova F.N. Antigeny` AVO sistemy`. Voprosy` biologicheskoi`, meditsinskoi` i farmatsevticheskoi` himii. 2013. № 8. P. 21-27.

11. Гильмиярова Ф.Н., Гергель Н.И., Давыдкин И.Л., Косякова Ю.А., Епифанова А.А. ABO-группспецифические особенности эритроцитов в норме и при гемофилии. *Гематология и трансфузиология*. 2012.

Gil'miiaarova F.N., Gergel' N.I., Davy'dkin I.L., Kosiakova Iu.A., Epifanova A.A. ABO-gruppospetsificheskie osobennosti e`ritrotcitov v norme i pri gemofilii. Gematologiya i transfuziologiya. 2012.

12. Yamamoto F. Molecular genetics of ABO. *Vox Sang*. 2000. Vol. 78. Suppl. 2. P. 91-103.



УДК: 577.175.524:616.61+616.379-008.64

Код специальности ВАК: 14.01.02, 14.01.04

НЕФРИН – РАННИЙ МАРКЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

Н.А. Яркова,

ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия»

Яркова Наталья Александровна – e-mail: n.yarkova@mail.ru

Цель: определить величину экскреции с мочой нефрина и уточнить его значение как раннего маркера повреждения почек при сахарном диабете (СД) 2-го типа. Материалы и методы. Были обследованы 97 пациентов с СД 2-го типа. Средний возраст больных составил 56 [51,7; 64] лет, по данным анамнеза средняя длительность СД 2-го типа 7,6 [1,5; 8,9] года. Всем пациентам определяли нефрин, микроальбумин, креатинин, рассчитывали скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по формулам. Результаты. По данным исследования повышение уровня нефрина в моче наблюдалось у всех обследованных пациентов СД 2-го типа. Нефринурия при диабетической нефропатии коррелирует с альбуминурией, уровнем креатинина, гликозилированным гемоглобином, артериальным давлением и СКФ. Заключение. Структурные и функциональные нарушения подоцитов, ассоциированные с метаболическими, эндокринными и гемодинамическими расстройствами при СД 2-го типа, наблюдаются уже на ранних этапах формирования диабетической нефропатии (ДН), предшествуя развитию клинически значимой альбуминурии.

Ключевые слова: нефрин, биомаркеры, хроническая болезнь почек, сахарный диабет 2-го типа.

Objective: determine nephrin in urine and clarify its significance as an early marker of kidney damage in type 2 diabetes mellitus. Materials and methods. 97 patients with type 2 diabetes were examined. Mean age of patients was 56 [51,7; 64] years, according to the history of the average duration of type 2 diabetes 7,6 [1,5; 8,9] years. All patients were assigned nephrin, microalbumin, creatinine, calculated the glomerular filtration rate (GFR) by formulas. Results. According to the study, an increase in the level of nephrin in the urine was observed in all examined patients with type 2 diabetes. Nephrinuria in diabetic nephropathy correlates with albuminuria, creatinine, glycosylated hemoglobin, arterial pressure, and GFR. Conclusion. Structural and functional disorders of podocytes, associated with metabolic, endocrine and hemodynamic disorders in type 2 diabetes, are already observed at the early stages of the formation of diabetic nephropathy, preceding the development of clinically significant albuminuria.

Key words: nephrin, biomarkers, chronic kidney disease, diabetes mellitus.

Введение

Традиционно основной патологический процесс в почках определяют по концентрации креатинина в сыворотке крови, скорости клубочковой фильтрации и микро/макроальбуминурии [1]. Однако, как показали морфологические исследования, характерные для сахарного диабета (СД) изменения в ткани почек уже выявляются у пациентов с нормальной экскрецией альбумина с мочой, появление микроальбуминурии (МАУ) свидетельствует о наличии склероза не менее чем в 20–25% нефронов, а прогрессирование до стадии протеинурии (ПУ) – о поте-

ре 50–70% клубочков [2; 3]. В результате активного поиска методов ранней диагностики появился маркер, способный выявлять повреждение почек раньше, чем традиционные показатели.

Нефрин, трансмембранный белок подоцитов с м.м. 160 кДа, продукт гена NPHS1, является основным структурным белком щелевой фильтрационной диафрагмы и относится к адгезивным белкам суперсемейства иммуноглобулинов [4; 5]. Участвует в формировании почечного фильтра, при повреждении почек наблюдается усиленная экскреция с мочой. Уточнение механизмов

повреждения подоцитов при СД, их связи с метаболическими и гемодинамическими нарушениями, поиск биомаркеров, отражающих выраженность дисфункции подоцитов, являются предметом пристального внимания диабетологов и нефрологов.

Цель исследования: определить величину экскреции с мочой нефрина и уточнить его значение как раннего маркера повреждения почек при СД 2-го типа.

Материал и методы

В исследование были включены 97 пациентов (34 мужчин и 63 женщины) с СД 2-го типа, которые были госпитализированы в нейроэндокринологическое отделение Нижегородской областной клинической больницы им. Н.А. Семашко. Средний возраст больных составил 56 [51,7; 64] лет. По данным анамнеза средняя длительность СД 2-го типа составила 7,6 [1,5; 8,9] года, включая впервые выявленный СД 2-го типа у 30 пациентов. Диагноз СД 2-го типа устанавливался согласно национальным стандартам по диагностике и лечению сахарного диабета [6].

Всем больным были проведены клиническое и лабораторно-инструментальное обследования. Гликозилированный гемоглобин HbA1c исследовали на анализаторе Д-10 производства «Bio-Rad» со стандартными наборами (Франция). Уровень креатинина определяли в плазме венозной крови по методу, основанному на реакции Яффе, с использованием диагностических систем ООО «Ольвекс Диагностикум» (Санкт-Петербург, Россия), уровень мочевины – с помощью диагностического набора «Диакром Н» на анализаторе «Статсфакс». СКФ рассчитывалась с помощью формул Cockcroft-Gault, стандартизованная на поверхность тела, MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) и уравнения CKD-EPI [6–8].

Для верификации диагноза диабетической нефропатии (ДН) исследовалась утренняя моча на микроальбуминурию (МАУ) турбометрическим методом на автоматическом анализаторе «Chem Well» с использованием диагностического набора «Microalbumin» (США). Нормальным считали показатель ниже 30 мг/сутки. Как микроальбуминурию расценивали результат от 30 до 300 мг/сутки [6; 9–12]. В случае превышения МАУ определяли содержание белка в суточной моче.

Согласно цели нашего исследования всем пациентам определяли нефрин в асептически собранной утренней порции мочи (средняя струя). Полученные образцы мочи центрифугировали 10 минут при 3000 об./мин с последующим немедленным анализом иммуноферментным способом в микропланшетном формате на автоматическом приборе «EVOLIS Twin Plus Bio-Rad» (Франция). Иммуноферментный анализ (ИФА) включал в себя следующие стадии: 1) образование иммунного комплекса; 2) стадия формирования связи конъюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания; 3) стадия превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал. Результаты ИФА регистрировали с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Допустимая регистрация результатов только с фильтром 450 нм [4]. Нормальные значения нефрина в моче 0,118–20 нг/мл.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программы Statistica 7.0. При анализе данных применялись методы непараметрической статистики, в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей (Me [25p; 75p]), достоверность отличий независимых групп по одному признаку определили методом ANOVA по Краскелу–Уоллису. Анализ корреляционных взаимоотношений между исследуемыми показателями осуществлялся с помощью критерия Спирмена с обязательным визуальным контролем диаграмм рассеяния и исключением выбросов. Различия считались достоверными при значениях $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Клубочковый барьер состоит из трех слоев: сосудистого эндотелия, гломерулярной базальной мембраны и щелевой диафрагмы, расположенной между ножками подоцита. Если раньше основное значение в происхождении протеинурии придавалось состоянию базальных мембран клубочковых капилляров, то в последнее время становится очевидной роль белков подоцитов [2–4]. Заболевания клубочков сейчас признаны в большинстве случаев как патология подоцитов и частично вызваны изменением генов подоцитарных белков.

Щелевая диафрагма, играющая важную роль в поддержании структуры и функционирования фильтрационного барьера, представляет собой специализированный межклеточный контакт между соседними ножками подоцитов и состоит из сложного мультибелкового сигнального комплекса, который динамически контролирует архитектуру подоцитарной ножки посредством передачи сигнала на актин цитоскелета. Сигнальный комплекс щелевой диафрагмы содержит структурные белки, рецепторы, сигнальные адаптеры, ионные каналы и вспомогательные поддерживающие белки (рис.). Он необходим также для регуляции других биологических функций подоцита (организация цитоскелета, эндоцитоз, дифференцировка и подавление пролиферации, жизнеспособность подоцитов).

Нефрин, белок с м.м. 160 кДа, продукт гена NPHS1, является основным структурным белком щелевой фильтрационной диафрагмы и относится к адгезивным белкам суперсемейства иммуноглобулинов. Нарушения в структуре как самого нефрина, так и ассоциированного с ним белкового комплекса приводят к нарушениям архитектоники подоцитов, сглаживанию отростков ножек подоцитов и протеинурии [4]. По данным литературы, определение нефрина в моче в качестве маркера подоцитарной дисфункции у пациентов с хроническим гломерулонефритом позволяет оценить тяжесть подоцитарной дисфункции, активность заболевания и прогнозировать ответ на иммуносупрессирующую терапию [2; 3].

По данным нашего исследования, нефринурия присутствовала у 100% больных с СД 2-го типа с микро- и макроальбуминурией, а также у пациентов с нормоальбуминурией. Клинико-лабораторные данные пациентов в зависимости от стадии диабетической нефропатии представлены в таблице. Следует подчеркнуть, что все пациенты были сопоставимы по исходному уровню гликозилированного гемоглобина и индексу массы тела (ИМТ).

Статистически достоверные различия между группами пациентов с нормоальбуминурией и документированной ДН были достигнуты по следующим показателям: нефрину, суточной экскреции микроальбумина, содержанию мочевины, креатинина и СКФ ($p < 0,05$). Группы также имели статистически значимую разницу по САД и ДАД, что еще раз подтверждает тот факт, что артериальная гипертензия является одним из ведущих факторов прогрессирования ДН [9; 11; 12].

Согласно цели настоящего исследования мы попытались выявить зависимость между уровнем нефрина и другими лабораторными показателями. Были отмечены следующие статистически значимые корреляционные связи с микроальбуминурией ($r=0,72$, $p=0,001$), гликозилированным гемоглобином ($r=0,54$, $p=0,001$), креатинином ($r=0,42$, $p=0,003$), САД ($r=0,56$, $p=0,002$), ДАД ($r=0,23$, $p=0,005$) и СКФ ($r=-0,42$, $p=0,001$). Слабые корреляционные связи (статистически незначи-

мые) установлены между нефрином и возрастом пациентов ($r=0,18$, $p=0,05$), ИМТ ($r=0,11$, $p=0,05$).

Таким образом, нефринурия при диабетической нефропатии коррелирует с альбуминурией, уровнем креатинина, гликозилированным гемоглобином, артериальным давлением и СКФ. Экскреция нефрина увеличена при СД еще до альбуминурии и снижения СКФ, что имеет преимущество для раннего обнаружения повреждения почек у данной категории больных.

Выводы

Структурные и функциональные нарушения подоцитов, ассоциированные с метаболическими, эндокринными и гемодинамическими расстройствами при СД 2-го типа, наблюдаются уже на ранних этапах формирования ДН, предшествуя развитию клинически значимой альбуминурии. Использование неинвазивной оценки нефрина в моче для ранней диагностики повреждения почек при СД 2-го типа представляет большой интерес и несомненно имеет перспективы.

МА

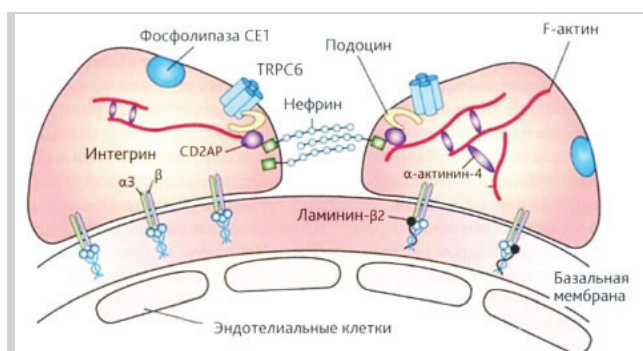


РИС.

Схема ножки подоцита с изображением важнейших белков, участвующих в подоцитарной функции.

ТАБЛИЦА.

Клинико-лабораторные показатели пациентов СД 2-го типа в зависимости от стадии диабетической нефропатии (Ме [25p; 75p])

Показатель	НАУ, n=35	МАУ, n=46	ПУ, n=11	ХПН, n=5	p
НbA1c, %	8,4 [6,9;10]	8,7 [7,3;10,2]	8,7 [7,5;9,8]	8,9 [7,6;10,3]	0,7
МАУ мг/сутки	15,46 [12,1;18,9]	70,2 [35,8;88,2]	416,04 [364,8;509,3]	-	0,01
САД, мм рт. ст.	140,7 [120;150]	146,5 [130;160]	157 [150;165]	152,5 [145;160]	0,04
ДАД, мм рт. ст.	86,9 [80;90]	89,6 [80;100]	96 [90;100]	96,2 [86;100]	0,04
ИМТ, кг/м ²	33,2 [29,8;35,0]	32,7 [30,1;35,3]	34,7 [34,6;36,9]	30,5 [27,4;32,6]	0,07
Креатинин, мкмоль/л	75,9 [63;87]	79,8 [57;92]	132,6 [92;173]	223,5 [215,5;231,5]	0,01
СКФ по Cockcroft-Gault, мл/мин	123,87 [91;143]	116,5 [83;150]	87,3 [65;125]	33,2 [25,5;40,5]	0,02
СКФ по MDRD, мл/мин/1,73м ²	87,6 [69;106]	91,46 [64;121]	55,1 [40;70]	22,7 [20;25,5]	0,04
СКФ-ЕПІ, мл/мин/1,73м ²	69,6 [57,9;80,2]	65,86 [53,4;83]	56,8 [47,5;72,6]	22,36 [21,3;23,3]	0,04
Нефрин, нг/мл	21,6 [20,8;50]	55,8 [51,9;80,2]	89,6 [81,4;105]	156 [143;230]	0,04

Примечание: НАУ – нормоальбуминурия; МАУ – микроальбуминурия; ПУ – протеинурия; ХПН – хроническая почечная недостаточность.

ЛИТЕРАТУРА

- Бобкова И.Н., Шестакова М.В., Шукина А.А. Диабетическая нефропатия – фокус на повреждение подоцитов. *Нефрология*. 2015. Т. 19. № 2. С. 33-43.
- Бобкова И.Н., Шестакова М.В., Шчуккина А.А. *Diabeticheskaya nefropatiya – focus na povrezhdenie podocitov*. *Nefrologiya*. 2015. Т. 19. № 2. С. 33-43.
- Шукина А.А., Бобкова И.Н., Шестакова М.В., Викулова О.К. Экскреция с мочой маркеров повреждения подоцитов у больных сахарным диабетом. *Терапевтический архив*. 2015. № 10. С. 62-66.
- Shchukina A.A., Bobkova I.N., Shestakova M.V., Vikulova O.K. *E'kskrecii s mochej markerov povrezhdeniya podocitov u bol'nyh saharnym diabetom*. *Terapevticheskij arhiv*. 2015. № 10. С. 62-66.
- Cranier C., Makni K., Molina L. Gene and protein markers of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2008. № 23. P. 7922-7929.
- Иммунохимический анализ в лабораторной медицине. Учебное пособие /под ре. В.В. Долгова. М.-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2015. 418 с.
- Lebedeva N.O., Vikulova O.K. *Immunoхимический анализ в лабораторной медицине*. Учебное пособие /под ред. В.В. Долгова. М.-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2015. 418 с.
- Лебедева Н.О., Викулова О.К. Маркеры доклинической диагностики диабетической нефропатии у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа. *Сахарный диабет*. 2012. № 2. С. 38-45.
- Lebedeva N.O., Vikulova O.K. *Markery doklinicheskoi diagnostiki diabeticheskoi nefropatii u pacientov s saharnym diabetom 1 tipa*. *Saharnyj diabet*. 2012. № 2. С. 38-45.
- Дедов И.И., Шестакова М.В. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Вып. 7. Проблемы эндокринологии. 2015. № 1. Т. 61. С. 10-13.
- Dedov I.I., Shestakova M.V. *Algoritm specializirovannoj medicinskoj pomoshi bol'nyh saharnym diabetom*. *Vip. 7. Problemy e'ndokrinologii*. 2015. № 1. Т. 61. С. 10-13.
- Pierrat A., Gravier E., Saunders C. et al. Predicting GFR in children and adults: a comparison of the Cockcroft-Gault, Schwartz and Modification of Diet in Renal Disease formulas. *Kidney Int*. 2003. № 64. P. 1425-1436.
- Vervoort G., Willems H.L., Wetzels J.F. Assessment of glomerular filtration rate in healthy subjects and and normoalbuminuric diabetic patients: validity of a new (MDRD) prediction equation. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2002. Vol. 17. P. 1909-1913.
- Cederholm J., Eliasson B. et al. For the steering committee of the Swedish National Diabetes Register. Microalbuminuria and risk factors in type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2005. № 67. P. 258-266.
- Parving H-H., Lewis J.B. et al. DEMAND investigators. Prevalence and risk factors for microalbuminuria in a referred cohort of type II diabetic patients: a global perspective. *Kidney Int*. 2006. № 69 (11). P. 2057-2063.
- Jermendy G., Ruggenti P. Preventing microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism*. 2007. Vol. 23. № 2. P. 100-110.
- The Diabetes Control and Complications Research Group: Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes control and Complications Trial. *Kidney Int*. 1995. № 47. P. 1703-1720.