

© В.С.Пилотович, В.С.Финин, 2011
УДК 616.61-072.2

В.С. Пилотович¹, В.С. Финин²

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА СПИНОВОГО ЗОНДА В ДИАГНОСТИКЕ БОЛЕЗНЕЙ ПОЧЕК

V.S. Pilotovich, V.S. Finin

SPIN PROBE METHOD USAGE IN KIDNEY DISEASES DIAGNOSTIC

¹Кафедра урологии и нефрологии Белорусской медицинской академии последипломного образования, ²Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

РЕФЕРАТ

Разработан, испытан и внедрен в клиническую практику новый неинвазивный экспресс-метод определения функциональной активности почек, основанный на исследовании минимальных объемов периферической крови. Метод определения параметров спинных зондов в сыворотках крови 177 больных с первичными и вторичными заболеваниями почек показал его преимущества перед традиционными методиками в отношении ранней идентификации патологии нефронов. Ранняя диагностика почечных дисфункций у больных с некоторыми системными заболеваниями (сахарный диабет, артериальная гипертензия, атеросклероз и др.) позволит проводить нефропротективную (защитную) терапию, уменьшить, тем самым, число больных с тяжелой почечной недостаточностью и сократить применение дорогостоящих методов внепочечного очищения крови.

Ключевые слова: болезни почек, диагностика, спинные зонды.

ABSTRACT

New noninvasive express method of kidneys functional activity specification, based on research of minimal peripheral blood volume, was developed, tested and introduced in clinical practice. Spin probe parametrization method in blood serum of 177 patients with prior and secondary kidney diseases shown its advantage over traditional methodics in reference to nephron pathology incipient identification. Renal disfunction incipient diagnostic at patients with some systemic diseases (diabetes, arterial hypertension, atherosclerosis, etc.) will provide nephroprotective (protective) therapy, decrease patient census with severe kidney failure and reduce expensive methods of extrarenal blood elimination employment.

Key words: kidney diseases, diagnostic, spin probe

ВВЕДЕНИЕ

Ранние функциональные расстройства при большинстве почечных заболеваний носят обратимый характер, что при адекватном лечении позволяет либо полностью восстановить деятельность нефронов, либо приостановить на длительное время фибротический процесс, ведущий к полному прекращению деятельности почек и смерти больного от уремии.

На настоящем этапе в нефрологии остро стоит вопрос о максимально ранних выявлениях почечных дисфункций и начале так называемых нефропротективных мероприятий, включающих изменение образа жизни (курение, потребление алкоголя, двигательная активность), пищевые ограничения (потребление белка, соли, жиров) и применение ряда специфических лекарственных средств.

Существующие в практическом здравоохране-

нии методы оценки функционального состояния почек [определение концентрационной способности, ацидификации мочи, расчета скорости клубочковой фильтрации (СКФ), эффективного почечного кровотока и плазмотока] позволяют в большинстве случаев выявлять болезнь в поздних стадиях, когда профилактические мероприятия оказываются несостоятельными для поддержания длительной функциональной активности почек.

В этой связи не случайно наш интерес обращен к возможностям биофизических (биомедицинских) методов исследования, основанных на оценке тонких механизмов клеточного метаболизма, которые страдают прежде всего. При этом ориентация делается на разработку неинвазивных и скоростных (экспресс) методов, дающих быстрый и достоверный ответ на произошедшие отклонения. К таким методам относится определение параметров связывания спинных зондов с различными компонентами крови, что характеризует транспортные и детоксикационные свойства белков и липопротеидов системы кровообращения [1–3].

Пилотович В.С. 220116, Беларусь, г. Минск, ул. Алибегова, 18 – 12, Белорусская медицинская академия последипломного образования, кафедра урологии и нефрологии. Тел.: +375296807097; факс: + 375172923435; E-mail: kirill_ka@tut.by.

Целью настоящей работы была оценка изменений связывающих характеристик альбумина и липопротеидов крови пациентов с различными заболеваниями почек и изучение возможности применения метода для ранней диагностики функциональных расстройств.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовательскую группу, состоящую из 177 пациентов, находившихся на лечении в отделениях нефрологии и гемодиализа 1-й городской клинической больницы г. Минска, включены больные как с первичными (гломерулонефрит, тубулоинтерстициальный нефрит), так и вторичными (сахарный диабет, артериальная гипертензия) болезнями почек. Причем у 91 из них (51,4 %), по данным рутинных исследований, экскреторная функция почек была в пределах нормы, у 41 (23,1%) – расстройства функции были среднего уровня, а у 45 (25,4%) – они носили тяжелый характер.

Методом спинного зонда оценивали связывающую способность белков (главным образом альбумина) и липопротеинов крови, которая нарушается при различных заболеваниях. Набор спинных зондов состоял из меченной доксильным радикалом среднецепочечной (лаурат) – 7ДЛ жирной кислоты и бензо-γ-карболинового (БГК) иминоксильного зонда.

Мы учитывали, что зонды на основе жирных кислот селективно связываются в плазме крови с соответствующими центрами молекул сывороточного альбумина (СА), причем степень их фиксации зависит от «загрузки» молекул альбумина метаболитами, токсинами, лекарственными соединениями и т.п. [4].

Отдельные метаболиты, лекарственные препараты, а также уремические токсины, такие как карбоксиметилпропилфуранпропионовая кислота, индоксил сульфат, гиппурат, индолуксусная кислота, связываются в русле крови со связывающими участками II типа альбумина [5]. На этих же сайтах белка (или в непосредственной близости) сорбируются и молекулы средней жирной кислоты – спинного зонда 7ДЛ, которые конкурируют за места связывания с рядом метаболитов, выводящихся в норме почками. При этом связывание данного зонда при почечной патологии существенно снижается, и в сыворотке крови больных с заболеваниями почек его свободная концентрация растет. Параметр, измеряемый для зонда 7ДЛ в сыворотках крови, – константа диссоциации (кажущаяся).

Зонд БГК [6], кроме частичной сорбции на альбумине, в большей степени связывается с липопротеиновыми фракциями сыворотки крови, поскольку

имеет к ним значительное сродство. Хотя точная локализация мест связывания этого зонда не установлена, наши экспериментальные данные говорят о неравномерном распределении молекул зонда по фракциям липопротеидов. В качестве параметра для гидрофобного зонда БГК использовали концентрацию свободного зонда при выравнивании концентраций альбумина в сыворотке. Поэтому уменьшение параметров, измеряемых для зонда БГК, указывает на рост липопротеинов в циркулирующей крови, что, по нашему мнению, ассоциировано как с увеличением их синтеза, так и выходом их из депо.

На рис. 1–3 показаны типичные спектры ЭПР обоих спинных зондов в сыворотках крови здоровых доноров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены основные показатели, характеризующие состояние паренхимы и суммарную функцию почек в исследуемых группах больных. При этом в качестве контрольной группы были выбраны здоровые доноры ($n = 22$), сыворотка крови которых подвергалась такому же анализу, как и сыворотка представителей опытных групп.

Из данных таблицы следует, что хронические заболевания почек, независимо от нозологии и сопутствующих осложнений, во-первых, сопровождаются определенными сдвигами в традиционных показателях, которые, естественно, более выражены у пациентов, имеющих функциональные расстройства. Однако у лиц с неактивными формами заболеваний признаков дисфункции при использовании стандартных методов не фиксировалось вообще или разница в значениях параметров по отношению к здоровым лицам была статистически недостоверной.

Так, например, сравнивая показатели водно-электролитного обмена у больных с артериальной гипертензией (АГ) и здоровых лиц, мы видим несущественные различия в концентрации натрия: 132 ± 12 против 143 ± 13 моль/л, калия $5,3 \pm 0,04$ против $5,5 \pm 0,03$ моль/л, мочевины $4,8 \pm 0,93$ против $6,2 \pm 0,25$ моль/л, средних молекул (СМ) $1,33 \pm 0,56$ против $1,48 \pm 0,41$ г/л и СКФ 88 ± 12 против 90 ± 11 мл/мин. Казалось бы, в этой группе пациентов повышение артериального давления не влияет на функциональную активность нефронов.

Однако средние показатели суточной протеинурии у больных с АГ оказались достоверно выше $0,187 \pm 0,08$ против $0,023 \pm 0,01$ г/сут ($p < 0,02$) по отношению к контролю. Такие же достоверные сдвиги выявлены и при определении параметров спинных зондов – 7ДЛ 163 ± 10 против 135 ± 12 ммоль/л

Сравнительная характеристика ряда функциональных показателей состояния почек у больных с различными нефропатиями

Группа пациентов	Потенурия, г/сут	Натрий сыво- ротки, ммоль/л	Калий сыво- ротки, ммоль/л	Мочевина сыво- ротки, ммоль/л	СМ сыво- ротки г/л	СКФ, мл/мин	ЭПП, мл/мин	К _{дл}	F _{БГК}
Здоровые (контроль), n=22	0,023±0,01	132±12	5,3±0,04	4,8±0,93	1,33±0,56	88±12	566±123	135±12	6,89±0,62
Артериальная гипертензия, ХБП 2, n=9	0,18±0,08	143±13	5,5±0,03	6,2±0,25	1,48±0,41	90±11	594±106	163±10	4,29±0,16
Гломерулонефрит, ХБП 2, n=14	1,22±0,34	145±10	5,3±0,04	5,9±1,1	1,55±0,48	76±14	532±98	251±18	4,68±0,19
Гломерулонефрит, ХБП 3, n=21	0,97±0,25	137±8	5,5±0,02	12,3±1,6	1,68±0,55	44±12	434±62	296±14	3,27±0,21
Гломерулонефрит, ХБП 4, n=23	0,88±0,17	139±10	5,9±0,03	18±5,70	2,78±0,55	22±9	383±43	484±21	2,80±0,14
Хронический ТИН, ХБП 2, n=20	0,23±0,17	129±14	3,6±0,04	9,2±2,28	1,78±0,35	58±6	455±30	174±18	4,11±0,21
Сахарный диабет без нефропатии, n=28	0,12±0,09	137±12	4,6±0,06	8,3±1,24	1,66±0,30	98±12	539±36	187±13	5,99±0,30
Диабетическая нефропатия, ХБП II, n=20	2,21±0,34	142±10	5,6±0,06	9,0±0,67	1,98±0,53	118±15	593±63	193±19	4,40±0,17
Диабетическая нефропатия, ХБП 3, n=20	1,62±0,42	147±8	5,5±0,07	16,3±0,48	1,77±0,44	56±16	439±55	226±20	3,23±0,16
Диабетическая нефропатия, ХБП 4, n=22	1,37±0,37	148±10	5,9±0,05	22,2±0,25	2,12±0,32	32±12	383±26	487±24	3,10±0,13

Примечание. Гломерулярные заболевания представлены в основном хроническим нефритическим синдромом. У 17 из них (29,3%) диагноз подтвержден морфологически при нефробиопсии.

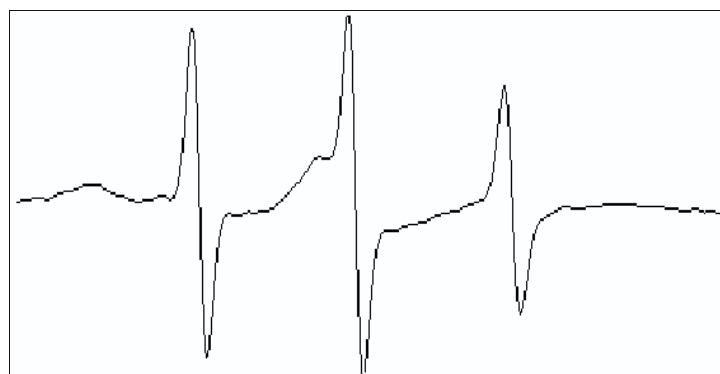


Рис. 1. Спектр ЭПР спиновго зонда 7ДЛ в сыворотке крови донора.

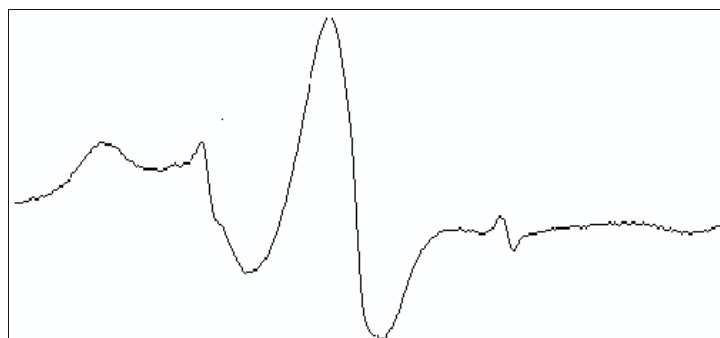


Рис. 2. Спектр ЭПР спиновго зонда БГК в сыворотке крови донора.

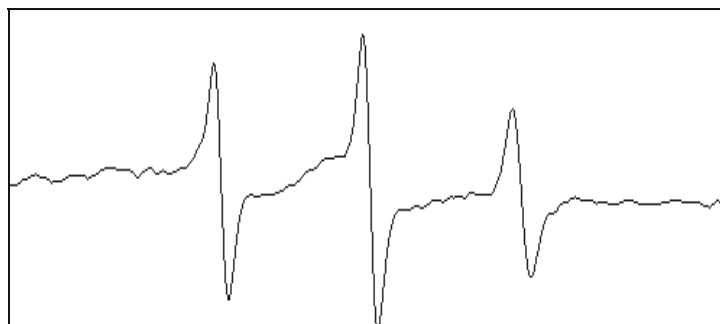


Рис. 3. Спектр ЭПР спиновго зонда 7ДЛ в сыворотке крови больного ХПН.

(<0,05) и F_{БГК} – 4,29±0,16 против 6,89±0,62 (p<0,05 соответственно).

Группа больных с хроническим первичным гломеруло-нефритом с сохраненной гломерулярной фильтрацией имеет примерно такую же динамику показателей: отсутствие сдвигов водно–солевого, азотистого обмена, но достоверные различия в суточной протеинурии – 1,22 ± 0,34 против 0,023 ± 0,01 г/сут (p<0,01) по сравнению с контролем. Судя по росту параметра спиновго зонда 7ДЛ в 1,85 раза (p<0,05) и снижение параметра БГК-зонда в 1,47 раза (p < 0,05) у пациентов этой группы транспортные и детоксикационные системы работают на пределе, так как их рецепторы перегружены ксенобиотиками и токсическими метаболитами.

Прогрессирование гломерулосклероза ведет к акцелер-

рации функциональных сдвигов, которые сопровождаются как нарастанием концентрации уремических токсинов, так и характерными изменениями параметров распределения обеих спинных меток.

Группа из 20 больных с тубулоинтерстициальным нефритом была достаточно разнородной, поскольку в нее включались как лица, длительно (не менее 3 мес) принимающие нестероидные, противовоспалительные средства с нефротоксическими эффектами, так и больные с развившейся аллергической нефротоксичностью, главным образом, на антибиотики.

С одной стороны, у них не отмечено серьезных отклонений в водно-электролитном и азотистом балансе и разница в суточной протеинурии не столь высока, но снижение эффективного почечного плазмотока 455 ± 30 против 566 ± 123 мл/мин ($p > 0,05$) и падение СКФ до 58 ± 6 мл/мин (в контроле 88 ± 12 мл/мин) близка к достоверным. В то же время, подъем параметра зонда 7ДЛ до 174 ± 18 ммоль/л и падение значений БГК-зонда до $4,11 \pm 0,21$ ммоль/л говорят о произошедших сдвигах в секреции и реабсорбции метаболитов различного класса.

Учитывая рост частоты сахарного диабета, нефрологи прогнозируют увеличение числа больных с диабетической нефропатией, отличающейся злокачественностью течения и быстрым переходом в азотемические стадии, требующие применения дорогостоящего почечно-заместительного лечения на основе высокотехнологичных и дорогих методологий. В этом плане предлагаемый подход к диагностике ранних дисфункций почек у больных с вторичными нефропатиями с помощью метода спинного зондирования компонентов крови подкупает своими широкими возможностями.

Проанализировав полученные нами клинко-лабораторные данные, представленные в таблице, мы констатируем следующее. В группе из 28 больных с сахарным диабетом, у которых нет четких признаков почечной патологии, за исключением нестойкой микроальбуминурии у 10, выявлено повышение параметра спинного зонда 7ДЛ в 1,4 раза ($p < 0,05$) и падение значения зонда БГК в 1,15 раза ($p > 0,05$). Эти сочетания свидетельствуют о начавшихся структурных и функциональных нарушениях на ранних стадиях болезни, которые нами ранее доказаны путем пункционной биопсии и расчета концентрационных индексов [4]. Иными словами, даже применяя изолированно исследования параметров распределения спинных зондов, мы можем среди пациентов с хроническими системными заболеваниями выделять группу риска почечных осложнений и организовывать динамический контроль за ними в амбулаторных условиях, в том

числе с использованием нового разработанного нами метода.

Лабораторные признаки нарушения функции почек при диабетической нефропатии – повышение, а затем снижение скорости клубочковой фильтрации до 40–50% от нормы, появление стойкой азотемии – повышение концентрации мочевины, креатинина и β_2 -микроглобулина, наряду с клиникой уремического синдрома, сопровождаются и значительными сдвигами значений параметров обоих спинных зондов. Так, параметр распределения спинного зонда 7ДЛ вырос до 226 ± 20 , т.е. в 1,67 раза ($p < 0,01$), а зонда БГК упал до $3,23 \pm 0,16$ (в 2,1 раза, $p < 0,05$), что согласуется и с другими лабораторными показателями, подтверждая выявленную закономерность в проявлениях уремической интоксикации.

Ну и, наконец, наиболее выраженные сдвиги, как и ожидалось, в показателях распределения спинных зондов, как, впрочем, и в биохимических данных, наблюдались у больных с сахарным диабетом и IV стадией ХБП. Наряду с азотемией, снижением СКФ и ЭПП до 10–15% от нормативных значений, отмечалась гиперкалиемия у половины больных, гиперпептидемия у 35%, что принималось к сведению при определении показаний к началу программного гемодиализа.

В этой группе больных были зафиксированы наибольшие изменения и параметров спинных зондов – подъем в 3,6 раза ($p < 0,001$) для зонда 7ДЛ и снижение в 2,2 раза ($p < 0,01$) параметра зонда БГК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании нашего исследования, проведенного в клинических условиях, учитывая сравнительные характеристики течения хронических заболеваний почек на разных стадиях, можно с уверенностью говорить, что для практического здравоохранения разработана высоко достоверная методика раннего выявления суммарных дисфункций нефронов. Ее внедрение даст возможность выделять пациентов группы риска, у которых следует начинать нефропротекторную терапию, что позволит уменьшить число лиц с поздними стадиями ХБП и сократить, тем самым, затраты на обеспечение дорогостоящих методов внепочечного очищения крови – гемо- и перитонеального диализа и, в конечном итоге, пересадки почки.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Livshits VA, Marsh D. Fatty acid binding sites of serum albumin probed by non-linear spin-label EPR. *Biochim Biophys*

Acta 2000; 1466; 350-360

2. Jalan R, Schnurr K, Mookerjee RP et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology* 2009; 50(2): 555-564

3. Matthes G, Seibt G, Hersmann G et al. Albumin transport analysis of different collected and processed plasma products by electron spin resonance spectroscopy. *Transfusion Apheresis Sci* 2002; 27; 129-135

4. Финин ВС, Пилотович ВС. Изучение связывающей

способности альбумина крови в норме и при заболеваниях. *Известия НАНБ. Сер хим наук* 2004; (2); 109-110

5. Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. 5. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin *Biol Pharm Bull* 2002; 25(6); 695-704

6. Кузнецов АН. *Метод спинного зонда. Основы и применение.* Наука, М., 1976; 211

Поступила в редакцию 13.06.2011 г.

Принята в печать 30.06.2011 г.