

## ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КАНАЛЬЦЕВОГО АППАРАТА ПОЧЕК У ДЕТЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 1

В статье проведена оценка состояния концентрационной (по физико-химическим показателям состава мочи) и секреторной функций канальцев почек (по интенсивности аммионогенеза), а также степени повреждения нефроцитов (по уровню ферментурии) у здоровых детей и у больных сахарным диабетом типа 1 с различной длительностью заболевания.

Диабетическая нефропатия (ДН) в настоящее время стоит на первом месте по частоте как причина развития хронической почечной недостаточности в США, развитых странах Европы и России [1]. При сахарном диабете типа 1 она развивается у 40-50% больных. Начальные стадии диабетической нефропатии являются обратимыми, но они не проявляются клинически. Выявление лабораторных признаков диабетического поражения почек позволяет своевременно начать адекватную терапию на ранних бессимптомных этапах болезни и предотвратить или отсрочить развитие структурных нарушений. В настоящее время достоверным признаком диабетической нефропатии считают появление у больных сахарным диабетом микроальбуминурии [2]. У здорового человека клубочковый фильтр проявляет избирательность в отношении размера и заряда фильтруемых частиц – прохождение через него молекул с радиусом более 4 нм и частиц с отрицательным зарядом затруднено. Фильтрация плазменного белка альбумина препятствует главным образом его отрицательный заряд, а не размер молекулы (радиус 3,55 нм) [3, 4]. Повышение проницаемости клубочка для альбумина при сахарном диабете обусловлено метаболическими (гипергликемия, гиперлипидемия) и гемодинамическими нарушениями. Однако микроальбуминурия встречается не только при сахарном диабете, но и при гипертонии, гиперурикемии и ряде других состояний, а также у практически здоровых людей. Ее развитие может быть связано с нарушениями местного и системного кровообращения, обмена веществ, особенностями образа жизни людей [5]. Поэтому, несмотря на наличие научно обоснованных эффективных методов диагностики поздних осложнений сахарного диабета, остается актуальным поиск ранних, специфических маркеров поражения почек при этой патологии.

Одним из подходов к ранней диагностике диабетической нефропатии может служить оценка функционального состояния канальцевого аппарата нефрона. Показано, что канальцы при диабете очень рано вовлекаются в патологический процесс [6]. Поражение канальцев может привести к нарушению их функций – реабсорбции, секреции, синтеза. В проксимальном извитом канальце реабсорбируется большая часть профильтрованных белков. Поэтому появление альбуминурии и ее выраженность может рассматриваться не только как показатель состояния клубочкового фильтра, но и как показатель нарушения реабсорбционной функции канальцев. Для диагностики функционального состояния канальцевого аппарата предложены такие лабораторные тесты, как определение экскреции низкомолекулярных пептидов –  $\beta_2$ -микроглобулина, ретинолсвязывающего белка, лизоцима и др. Определение активности ферментов в моче, имеющих различную локализацию в нефроцитах (N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы, гамма-глутамилтранспептидазы, аланинаминопептидазы, щелочной фосфатазы и др.), позволяет определить не только наличие, но и глубину повреждения канальцевого эпителия. При незначительном повреждении почечной ткани в моче повышается активность ферментов, щеточной каймы (нейтральная  $\alpha$ -гликозидаза, гамма-глутамилтрансфераза, щелочная фосфатаза), при выраженном повреждении повышается активность цитоплазматических и лизосомальных ферментов, повышение активности митохондриальных ферментов указывает на некроз клеток [7, 8].

Повреждение дистального отдела канальца проявляется прежде всего в снижении концентрационной способности и в снижении выведения аммиака [9]. Концентрационную способность оценивают по величине

относительной плотности мочи. Важной функцией нефроцитов является аммиогенез – процесс образования и секреции в просвет канальца аммиака. В дистальном извитом канальце, в отличие от проксимального, секреция ионов  $H^+$  осуществляется против концентрационного градиента и требует расхода энергии. Секретируемые в просвет канальца ионы водорода могут находиться в свободном виде, значительная часть связывается фосфатным буфером (осуществляется ацидофикация, закисление мочи). Но решающую роль в связывании протонов водорода в дистальном канальце играет аммонийный буфер. Связывая ионы водорода в просвете канальцев, аммиак способствует их усиленной секреции нефроцитами и выведению из организма в составе аммонийных солей. В нормальных условиях 3/4 ежедневно секретируемых в канальцы ионов водорода выводится в виде аммонийных солей, остальные – как титруемые кислоты.

Синтез аммиака из глутамин протекает в митохондриях эпителия канальцев и зависит от массы функционирующих нефронов, наличия глутамин и активности глутаминазы нефроцитов, рН крови и мочи, уровня  $K^+$  в крови и объема циркулирующей крови. Способность увеличивать образование  $NH_3$  и экскрецию  $NH_4^+$  является основной адаптационной реакцией почек на кислую нагрузку [10]. При повреждении эпителия почечных канальцев аммиогенез нарушается.

**Цель исследования.** Выявление ранних признаков изменений функционального состояния канальцев почек у детей с сахарным диабетом типа 1 в зависимости от длительности заболевания и степени компенсации углеводного обмена.

**Материалы и методы.** Обследовано 106 детей (64 девочки и 42 мальчика) в возрасте от 3 до 16 лет, страдающих сахарным диабетом типа 1. В зависимости от длительности заболевания больные были разделены на следующие группы: больные с впервые выявленным сахарным диабетом (26 детей, возраст  $8,62 \pm 0,7$  лет), с длительностью заболевания до 2-х лет (24 ребенка, возраст  $11,17 \pm 0,69$  лет), со стажем от 2-х до 4-х лет (18 больных, возраст  $12,39 \pm 0,53$  лет), с длительностью заболевания от 4-х до 6-и лет (22 ребенка, воз-

раст  $12,36 \pm 0,59$  лет) и имеющие стаж заболевания 6 лет и больше (16 детей, возраст  $12,94 \pm 0,45$  лет). В контрольную группу были включены 30 детей (18 мальчиков и 12 девочек, средний возраст  $11,4 \pm 0,6$  лет) без клинических, лабораторных и анамнестических признаков поражения почек.

Скрининговое исследование мочи проводилось с помощью тест-полосок «Combur10Test» на анализаторе «Урилюкс» с определением 10 параметров, концентрационную способность оценивали по величине относительной плотности мочи. Интенсивность аммиогенеза определяли по содержанию аммонийных солей в моче (реакция Бертелота). Концентрацию креатинина и мочевины в моче и крови определяли кинетическим методом наборами реагентов фирмы «DiaSys» (Германия). Для оценки характера и степени повреждения эпителиальных клеток почечных канальцев измеряли мочевую экскрецию ферментов: нейтральной  $\alpha$ -гликозидазы, аланинаминопептидазы (ААП) и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТ). Активность нейтральной  $\alpha$ -гликозидазы измеряли по скорости образования глюкозы из мальтозы и выражали в микромолях распавшейся мальтозы за 1 час. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (набор реагентов «Новоглюк», «Вектор-Бест»). Активность ГГТ определяли кинетическим методом набором фирмы «DiaSys». Определение ААП проводили кинетическим фотометрическим методом с использованием реактивов «Сигма», США. Активность ферментов выражали в расчете на 1 ммоль креатинина мочи. Исследования проводились на программируемом фотометре «Стат-ФАКС» (США) и спектрофотометре «СФ-2000Био» (Россия). Статистическая обработка материала проводилась при помощи программы STATISTICA 6.0.

**Результаты.** В контрольной группе статистически значимых различий относительной плотности, интенсивности аммиогенеза, уровня ферментурии в зависимости от пола и возраста не выявлено.

Средние значения относительной плотности мочи, определенные мультипараметровыми тест-полосками, при различной длительности сахарного диабета достоверно не различались. В контрольной группе среднее

значение рН мочи составило  $6,8 \pm 0,18$ . Во всех группах, за исключением впервые выявленного СД, отмечаются достоверно более низкие значения рН мочи, определенные при помощи тест-полосок ( $p < 0,001$ ), что указывает на повышенное выделение  $H^+$ .

Минимальная интенсивность аммионогенеза (количество азота аммонийных солей  $289,40 \pm 38,89$  мг/л) наблюдалась при впервые выявленном сахарном диабете. При стаже до 4 лет интенсивность аммионогенеза более высокая, чем в контрольной группе, а реакция мочи более кислая, что, видимо, отражает функциональные изменения канальцевого аппарата в ответ на кислотную нагрузку. При стаже более 4 лет концентрация аммонийных солей в моче уменьшается и в дальнейшем практически не изменяется.

При пересчете количества аммонийных солей в моче на 1 ммоль креатинина оказалось, что только при стаже от 2 до 4 лет у больных СД уровень аммионогенеза не отличается от контрольных значений, достоверно повышен в первые два года после начала заболевания и при стаже более 4 лет. Максимальный уровень аммонийных солей в пересчете на креатинин наблюдался у детей при впервые выявленном сахарном диабете (в два раза выше, чем в контрольной группе). Полученная расчетная величина у детей с впервые выявленным сахарным диабетом объясняется минимальным (по сравнению с другими группами и с контролем) содержанием креатинина в моче у этих детей при высоком диурезе и не отражает достоверно продукцию аммонийных солей.

Концентрация азота аммонийных солей (мг/л), интенсивность аммионогенеза в расчете на 1 ммоль креатинина и рН мочи представлены в таблице №1.

Был проведен сравнительный анализ состояния концентрационной функции канальцев, рН мочи и ферментурии больных с сохраненной и со сниженной интенсивностью аммионогенеза. Критерием сохранности функции аммионогенеза считали уровень аммонийных солей в моче 200 мг/л и более. Полученные результаты представлены в таблице № 2.

В группе больных со сниженным аммионогенезом (аммонийный азот менее 200 мг/л) относительная плотность мочи статистически значимо снижена, что служит признаком нарушения концентрационной способности канальцев. Низкая концентрация креатинина и мочевины мочи у этих больных, вероятно, связана с разведением мочи вследствие повышенного диуреза, а не с нарушением фильтрации, т.к. концентрация в крови этих анализов не повышена. Достоверных различий концентрации глюкозы и кетоновых тел в моче не выявлено.

Между рН мочи и концентрацией аммонийных солей прослеживалась обратная корреляционная зависимость ( $r = -0,45$ ,  $p < 0,05$ ).

Активность ААП в моче при нарушении аммионогенеза в 1,5 раза выше по сравнению с этим показателем у больных с сохраненным аммионогенезом. Выявлена достоверная отрицательная корреляционная связь концентрации аммонийных солей и активности аланинаминопептидазы ( $r = -0,39$ ,  $p < 0,05$ ). Уровень активности нейтральной  $\alpha$ -гликозидазы мочи и ГГТ при нарушении аммионогенеза повышен, однако эти различия статистически не достоверны.

Изменение уровня ферментов в моче в зависимости от сохранности аммионогенеза представлены на графике 1.

Были также сопоставлены степень компенсации углеводного обмена и выражен-

Таблица 1. Интенсивность аммионогенеза и рН мочи при различной продолжительности СД типа 1 у детей

	Аммионогенез, мг/л	Аммонийные соли, мг/ммоль креатинина	рН мочи
Контрольная группа	$344,89 \pm 36,79$	$49,56 \pm 5,26$	$6,8 \pm 0,18$
СД впервые выявленный	$289,40 \pm 38,89$	$99,95 \pm 12,86^*$	$6,75 \pm 0,21$
Стаж СД до 2 лет	$487,52 \pm 71,37$	$88,7 \pm 11,44^*$	$5,81 \pm 0,20^*$
Стаж СД от 2 до 4 лет	$442,82 \pm 65,25$	$60,62 \pm 5,58$	$5,75 \pm 0,21^*$
Стаж СД от 4 до 6 лет	$343,14 \pm 59,87$	$82,85 \pm 6,37^*$	$5,77 \pm 0,22^*$
Стаж СД 6 лет и выше	$347,27 \pm 53,86$	$82,16 \pm 13,14^*$	$5,56 \pm 0,19^*$

\* – различия достоверны по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ )

Таблица 2. Результаты физико-химического и биохимического исследования мочи при сохраненной и сниженной интенсивности аммиониогенеза у детей с сахарным диабетом типа 1

	Интенсивность аммиониогенеза сохранена	Интенсивность аммиониогенеза снижена
	69	32
Аммонийные соли, мг/л	492,16±31,12*	138,5±7,96*
Аммонийные соли, мг/ммоль креатинина	95,86±6,45*	60,24±4,58*
pH мочи	5,78±0,12*	6,48±0,2*
Относительная плотность мочи	1014,35±0,63*	1008,13±0,63*
Глюкоза мочи, ммоль/л	37,54±3,09	47,34±3,61
Кетоновые тела, ммоль/л	3,39±0,65	3,48±0,87
Диурез, мл/мин	0,83±0,06*	1,37±0,23*
Креатинин мочи, ммоль/л	6,53±0,54*	2,59±0,23*
Мочевина мочи, ммоль/л	224,69±12,35*	112,36±9,31*
Нейтральная α-гликозидаза мочи, мкмоль мальтозы/ммоль креатинина за 1 час	45,78±5,55	69,88±13,7
ГГТ, Е/ммоль креатинина	3,13±0,35	3,55±0,25
ААП, нкат/ммоль креатинина	5,03±0,94*	8,62±0,99*

\*– различия достоверны,  $p < 0,05$

ность изменений показателей физико-химического и биохимического исследования мочи. Степень компенсации оценивали по уровню гликозилированного гемоглобина ( $HbA_{1c}$ ) в крови: содержание  $HbA_{1c}$  менее 6% – компенсированное; 6 – 8,9% – субкомпенсированное; более 9% – декомпенсированное течение сахарного диабета. При субкомпенсированном течении наблюдалось снижение уровня мочевины (218,37±21,06 ммоль/л) и ГГТ (1,96±0,34 Е/ммоль креатинина) в моче по сравнению с компенсированным течением (325,22±21,28 ммоль/л и 7,95±3,37 Е/ммоль креатинина), остальные показатели достоверно не отличались. При декомпенсации по сравнению с компенсированным течением отмечались достоверно более низкие показатели относительной плотности мочи (1011,97±0,64 и 1019,0±1,0 соответственно), снижение содержания аммонийных солей в моче (345,79±27,13 и 727,00±80,34 мг/л соответственно). Концентрация креатинина (4,70±0,35 ммоль/л) и мочевины мочи (173,54±10,98 ммоль/л) были также достоверно ниже, чем при компенсированном течении (11,45±2,6 и 325,22±21,28 ммоль/л соответственно). При этом увеличения креатинина и мочевины в крови выявлено не было.

При декомпенсированном течении активность нейтральной α-гликозидазы была повышена по сравнению с контролем, но

достоверно не различалась при различной концентрации гликозилированного гемоглобина в крови. Активность ГГТ была достоверно ниже при декомпенсированном течении по сравнению с компенсацией (3,62±0,27 и 7,95±3,37 Е/ммоль креатинина), а активность аланинаминопептидазы – достоверно выше (7,17±1,03 и 0,77±0,36 нкат/ммоль креатинина соответственно).

**Обсуждение результатов.** При анализе полученных результатов было выявлено, что у детей с впервые выявленным сахарным диабетом типа 1 происходит снижение содержания аммонийных солей в моче. При стаже заболевания до 4 лет интенсивность аммиониогенеза более высокая, чем в контрольной группе, а реакция мочи более кислая, что, видимо, отражает функциональные изменения канальцевого аппарата в ответ на кислотную нагрузку. При стаже более 4 лет концентрация аммонийных солей в моче уменьшается и в дальнейшем практически не изменяется, несмотря на выраженную кетонурию и снижение pH мочи. Отсутствие увеличения концентрации аммонийных солей в моче у больных сахарным диабетом со стажем может рассматриваться как признак ограничения компенсаторных возможностей нефрона, поскольку повышение образования  $NH_3$  и экскреции  $NH_4^+$  является основной адаптационной реакцией почек на кислотную нагрузку.

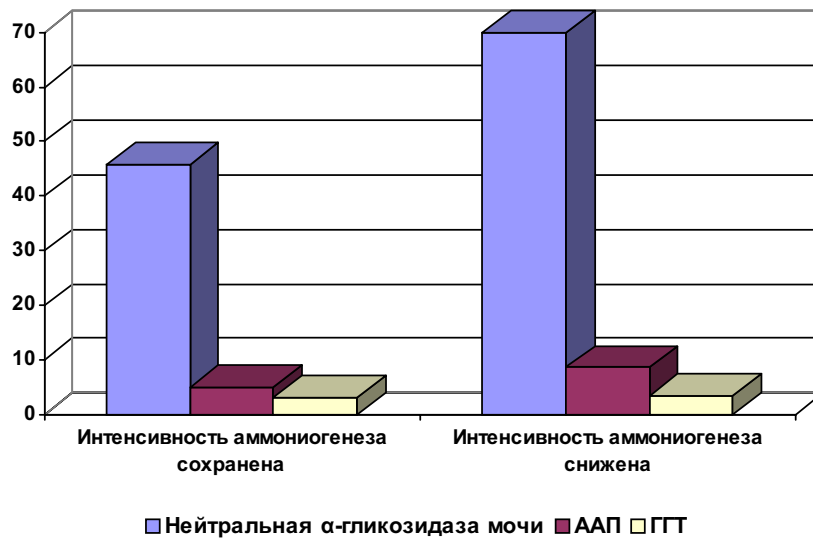


График 1. Уровень ферментурии при сохраненной и сниженной интенсивности аммионогенеза

Выявлено, что снижение аммионогенеза сопровождается снижением относительной плотности мочи (нарушение концентрационной функции) и достоверным повышением активности лизосомального фермента ААП – в 1,5 раза по сравнению с показателями при сохраненном уровне аммионогенеза.

Известно, что развитие диабетической нефропатии зависит не только от длительности заболевания, но и от степени компенсации углеводного обмена. Полученные нами результаты показывают, что при декомпенсированном течении сахарного диабета происходит выраженное нарушение концентрационной функции (снижение относительной плотности мочи) и нарушение аммионогенеза в эпителии почечных канальцев, приводящее к снижению в моче аммонийного буфера и ограничению компенсаторных возможностей нефрона. Декомпенсация сопровождается выраженным повышением актив-

ности аланинаминопептидазы – почти в 10 раз по сравнению с компенсацией.

Поскольку нейтральная  $\alpha$ -гликозидаза мочи имеет исключительно почечное происхождение [8], повышенная активность этого фермента у больных сахарным диабетом типа 1 по сравнению с контролем непосредственно указывает на вовлечение в патологический процесс канальцев нефрона. В сочетании с повышенной экскрецией почечных ферментов (нейтральной  $\alpha$ -гликозидазы и аланинаминопептидазы) нарушение аммионогенеза указывает на повреждение нефроцитов.

Снижение активности аммионогенеза или отсутствие повышения его активности в условиях кислотной нагрузки может рассматриваться как признак нарушения синтетической и секреторной функции эпителия почечных канальцев уже в ранние сроки заболевания.

#### Список использованной литературы:

1. Шестакова М.В., Сунцов Ю.И., Дедов И.И. Диабетическая нефропатия: состояние проблемы в мире и в России // Сахар. диабет. 2001; 3: 2-4.
2. Осложнения сахарного диабета (клиника, диагностика, лечение, профилактика) / Под ред. академика РАМН Дедова И.И. М., 1995.
3. Джеймс А. Шейман. Патопфизиология почки. Пер. с англ. – М. – СПб.: «Издательство БИНОМ» – «Невский Диалект», 1999.
4. Вандер А. Физиология почек. – СПб: Издательство «Питер», 2000.
5. Хирманов В.Н. Факторы риска: микроальбуминурия (обзор) / Тер. арх., 2004; 9 : 78-84.
6. Дедов И.И., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия. М.: Универсум паблишинг, 2000.
7. Намазова О.С. Исследование ферментов мочи в диагностике поражений почек. Педиатрия 1996;3
8. Лавренова Т.П. Ферменты мочи и их значение для диагностики поражения почек // Лабораторное дело, 1990; 7: 4-10
9. Хашен Р., Шейх Д. Очерки по патологической биохимии. М.: Медицина, 1981.
10. Фролов Б.А. Физиология и патология кислотно-основного состояния. М.: Медицина, 1998.