

На правах рукописи

Трифорова Александра Николаевна

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ПРОТЕИНУРИИ
И СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В МОЧЕ БЕРЕМЕННЫХ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2015

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» МЗ РФ)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук профессор **Островский Олег Владимирович**

Официальные оппоненты:

Карпищенко Анатолий Иванович - доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, профессор

Дорофейков Владимир Владимирович - доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта», заведующий лабораторией биохимии с клинко-диагностическим отделением

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2015 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.4/2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: <http://www.arcerm.spb.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

М.В. Санников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Общий белок является интегральным биохимическим показателем, а его определение – одним из наиболее часто выполняемых рутинных исследований в клинических лабораториях. При этом, несмотря на длительную историю и годами сложившуюся практику по определению общего белка в моче, до сих пор остается ряд нерешенных вопросов как в области аналитики, так и при клинической интерпретации полученных результатов.

С одной стороны, для использования в практике лабораторий был разработан и предложен ряд биохимических методов определения общего белка, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки [Эмануэль В.Л., 2010]. Однако аргументы в пользу выбора конкретного метода для ранней диагностики почечной патологии до сих пор остаются предметом обстоятельных обзоров и исследований [Петров В.И., 2012; Decramer S., 2008]. В силу чрезвычайно сложного белкового состава мочи и особенностей его изменения при разных патологиях почек, которые могут существенно влиять на результат определения общего белка мочи в случае конкретной нозологической формы, по-прежнему остается актуальным вопрос о выборе наиболее клинически информативного метода (с максимально достигаемой чувствительностью и специфичностью). В связи с этим внедрение нового метода в клиническую лабораторную практику имеет два аспекта. Первый аспект связан с тем, что аналитические характеристики метода должны быть приведены в соответствие с рекомендациями профессиональных ассоциаций. Второй аспект подразумевает клиническую интерпретацию полученных результатов метода в рамках принципов доказательной медицины. Следует отметить, что использование несертифицированных методик и реактивов в лабораторной практике приводит к существенному изменению клинического результата и снижению его достоверности.

Очевидно, что в настоящее время определение содержания только общего белка в моче для диагностики патологии почек является недостаточным [Barratt J., 2007; Ronco C., 2013]. Перспективным направлением представляется исследование специфических белков, указывающих на повреждение ткани почек [Decramer S., 2008; Ronco C., 2014]. Однако если биохимические маркеры повреждения таких органов, как печень, миокард, поджелудочная железа, хорошо изучены и их определение внедрено в клиническую практику, то биохимические маркеры повреждения почек находятся на различных стадиях разработки.

Следует отметить, что уровень протеинурии является одним из основных критериев для постановки диагноза преэклампсия и оценки степени её тяжести [Приказ МЗ РФ № 572н от 12.11.2012; Айламазян Э.К., 2012; Савельева Г.М., 2013]. Актуальность данной проблемы обусловлена тем, что преэклампсия остается одним из самых тяжелых осложнений беременности. В России, несмотря на наблюдающееся в последнее десятилетие снижение абсолютного числа родов, частота преэклампсии из года в год увеличивается и достигает 16 -

21%. По данным отечественных авторов, преэклампсия занимает 3-е место в структуре летальности беременных, на её долю приходится 15 - 25% случаев материнской смертности [Бикбов Б.Т., 2009; Антонова Т.Н., 2011]. Однако в литературе до сих пор нет четкого референтного диапазона для диагностики протеинурии беременных [Сухих Г.Т., 2012; Ray A.J., 2010; Brown M.A., 2012].

Для диагностики преэклампсии у беременных гинекологи используют критерии, предусмотренные порядком оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» [Приказ МЗ РФ № 572н от 12.11.2012]. Базовый спектр обследования беременных женщин включает ограниченную лабораторную панель тестов (общий анализ крови, общий анализ мочи, анализ суточной мочи на белок, биохимический анализ крови), поэтому поиск новых лабораторных маркеров для более ранней диагностики преэклампсии является весьма целесообразным.

Несомненно, особый интерес представляет изучение протеомного спектра мочи беременных в целях исследования изменений белковых фракций при развитии патологии беременных. Однако потенциальными маркерами преэклампсии и острого тубулярного поражения почек могут оказаться такие сравнительно легко определяемые индивидуальные белки, как цистатин С [Каюков И.Г., 2012; Inker L.A., 2012; Voskoboev N.V., 2012] и N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (NAG) [Jacob M., 2008; Capodicasa E., 2011; Adiyanti S.S., 2012; Han W.K., 2014].

Степень разработанности проблемы

Внедрение исследования протеинурии в клиническую лабораторную практику для диагностики патологии почек относится к началу XX в. в связи с появлением ряда методов определения общего белка. Большинство из них до сих пор используется в клинических лабораториях в качестве скрининговых методов. Однако проблема количественного определения концентрации общего белка в биологических жидкостях до настоящего времени окончательно не решена из-за наличия методических сложностей при исследовании низких концентраций общего белка и отсутствия четкой клинической интерпретации для различных групп пациентов [Вельков В.В., 2010]. Следует отметить, что в настоящее время большое количество публикаций посвящено фотометрическому методу с использованием пирогаллолового красного как основного для определения протеинурии [Пупкова В.И., 2007; Козлов А.В., 2012]. Однако остается нерешенной проблема количественной оценки протеинурии. По мнению экспертов Национального почечного фонда [National Kidney Foundation, 2014], для всех клинических ситуаций окончательное заключение о выраженности протеинурии должно основываться на определении белка в суточном объеме мочи. Другие исследователи отдают предпочтение оценке суточной потери белка с мочой по величине отношения белок (альбумин)/креатинин в случайном образце мочи. Кроме того данные по клинической интерпретации и референтным интервалам для различных групп пациентов, в том числе и такого специфического контингента, как беременные

женщины, до сих пор противоречивы [Новоселова О.В., 2007; Козлов А.В., 2012; Thangaratinam S., 2009].

Достижения протеомики последнего десятилетия, связанные с появлением высокочувствительных методов, позволили обнаружить в моче здорового человека более чем 1500 различных белков, среди которых может оказаться достаточное количество перспективных белков-маркеров повреждения ткани почек [Adachi J., 2006; Barratt J., 2007]. Следовательно, в настоящее время исследование протеома мочи, поиск новых маркеров для ранней диагностики ренальной патологии и преэклампсии, а также расширение лабораторной панели обследования пациентов с нефрологическими заболеваниями, в том числе и беременных, является весьма актуальным направлением. Этим продиктованы цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования – обосновать диагностические критерии протеинурии при беременности в зависимости от аналитических процедур определения общего белка и отдельных специфических белков.

Задачи исследования

1. Сравнить аналитические характеристики методов, наиболее часто используемых для определения общего белка в моче, и результаты его измерения разными методами у беременных.

2. Определить референтные значения протеинурии для обследования беременных.

3. Исследовать особенности белкового спектра мочи беременных методом нативного горизонтального электрофореза в агарозном геле.

4. Установить аналитические характеристики иммунотурбидиметрического метода определения концентрации цистатина С и исследовать его содержание в моче беременных.

5. Установить аналитические характеристики спектрофотометрического метода определения активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы и исследовать её активность в моче беременных.

6. Определить диагностические уровни протеинурии, цистатина С, активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы и белкового спектра мочи беременных с преэклампсией.

Научная новизна

Впервые в рамках одного исследования проведена клинико-аналитическая валидация 3-х рекомендованных Минздравом РФ методов определения общего белка в моче (метод с использованием пирогаллолового красного – ПГК, метод с использованием сульфосалициловой кислоты – ССК, метод «сухой химии» - ТП). При этом установлено, что метод ПГК позволяет обнаружить общий белок уже на уровне, характерном для микроальбуминурии. Впервые были оценены диагностические характеристики метода ПГК с учетом триместра беременности и установлена верхняя граница референтного интервала протеинурии для беременных.

Определены особенности белкового спектра мочи беременных и проведена оценка клинико-диагностической значимости определения белковых

фракций мочи с различной степенью протеинурии. Получены новые данные о частоте глобулинурии.

На основании международных и отечественных правил, руководств, рекомендаций проведена валидация методов определения специфических белков (цистатина С и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы) в моче, в ходе которой разработан оптимизированный протокол спектрофотометрического определения активности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы. На основании данного валидированного протокола предложена методика определения активности данного фермента для диагностики тубулярной патологии почек у беременных. Впервые показана диагностическая значимость изменения концентрации цистатина С и активности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы в моче беременных для ранней диагностики патологии почек у беременных при преэклампсии.

Теоретическая и практическая значимость

Впервые предложен референтный интервал протеинурии, полученный для колориметрического метода определения белка в моче с использованием пирогаллолового красного, для беременных женщин вне зависимости от триместра беременности, равный 0,02 – 0,15 г/л.

Установлено, что протеинурия беременных обусловлена альбуминовой, α_2 - и β -глобулиновой фракциями. Доказано, что учет уровня глобулиновых фракций имеет важное диагностическое значение наряду с альбуминовой фракцией.

В ходе работы получены новые данные о содержании цистатина С и активности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы в моче беременных. Установлено, что для беременных характерно увеличение содержания цистатина С в моче в I триместре. В то время как для NAG наблюдается тенденция к увеличению её активности в моче у беременных с диагнозом преэклампсия, что позволяет рассматривать данный фермент как наиболее перспективный маркер повреждения клеток проксимальных канальцев почек. Получены оценки референтных уровней концентрации цистатина С и активности NAG в моче беременных.

Методология и методы исследования

Для реализации поставленной цели научной работы были использованы анализ литературы, современные лабораторные методы исследования и методы статистической обработки данных. В основу положено проспективное когортное наблюдение.

Научные положения, выносимые на защиту

1. Концентрация общего белка в моче, равная 0,150 г/л, является верхним пределом референтного интервала для беременных.

2. Белковый спектр мочи беременных представлен в основном альбуминовой, α_2 - и β -глобулиновой фракциями, следовательно, белки, входящие в состав α_2 - и β -глобулиновой фракций, могут являться потенциальными маркерами повреждения почек при преэклампсии.

3. N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза мочи является перспективным маркером тубулярного повреждения почек у беременных с преэклампсией.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов исследования определяется достаточным и репрезентативным количеством данных, полученных впервые, с использованием арсенала современных методов исследования и подтверждена адекватными методами статистической обработки.

Материалы диссертации доложены на 68-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2010); на XV научно-практической конференции «Лабораторное обеспечение стандартов медицинской помощи» (Москва, 2010); на научно-практической конференции «Лабораторная наука – практике: первое десятилетие XXI века» (Москва, 2010); на Всероссийском конгрессе «Лабораторные технологии при организации медицинской помощи» (Москва, 2010); на Общероссийской научно-практической конференции «Обеспечение доступности современных лабораторных исследований: аналитические возможности, клинические потребности, организационно-экономические условия» (Москва, 2011); на Первой Всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века» (Москва, 2012).

Внедрение в практику

Полученные референтные значения протеинурии для колориметрического метода с использованием пирогаллолового красного внедрены в практику клинических лабораторий на базе ГУЗ «Волгоградский областной клинический перинатальный центр №2», ГУЗ «Волгоградский областной клинический перинатальный центр №1 им. Л.И. Ушаковой» для скрининга патологии беременности. Отдельные положения и выводы нашли применение в учебном процессе для подготовки врачей на кафедрах акушерства и гинекологии, клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «ВолгГМУ Минздрава РФ».

Личный вклад автора

Автором проанализированы современные данные литературы по теме диссертации, сформулированы цели и задачи работы, выбраны методы и подходы, отвечающие реализации поставленных задач.

Автором непосредственно проведены все указанные в работе лабораторные исследования, статистическая обработка и анализ полученного материала. Автором выполнен сбор и обработка клинических данных. Личный вклад автора в исследование составляет более 95%.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 3 – в изданиях, рекомендованном ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, состоит из введения, шести глав (обзор литературы; материалы и методы; 4 главы, описывающие результаты собственных исследований и обсуждение), выводов. Список литературы включает 42 отечественные работы и 131 зарубежный источник. Диссертация иллюстрирована 19 таблицами и 23 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 422 беременные женщины (322 женщины с нормально протекающей беременностью, 89 женщин с диагнозом преэклампсия, 5 женщин с диагнозом вызванные беременностью отеки с протеинурией, 6 женщин с диагнозом существовавшая ранее гипертензия с присоединившейся протеинурией), наблюдавшихся в МУЗ «Женская консультация № 1» г. Волгограда. Возраст обследованных беременных колебался от 18 до 45 лет. Результаты исследований сопоставляли с клиническим диагнозом амбулаторных карт беременных. Диагноз пациенткам выставлялся на основании нормативных документов (МКБ-10, 2007; Приказ МЗ РФ № 572н от 12.11.2012 г.; Клинический протокол «Гипертензия во время беременности. Преэклампсия. Эклампсия», 2012).

При исследовании содержания общего белка и белкового спектра мочи среди беременных оказались на I триместре беременности 39 женщин без патологии беременности и 1 с диагнозом вызванные беременностью отеки с протеинурией, на II триместре – 103 женщины без патологии беременности и 19 с диагнозом преэклампсия, на III триместре – 83 женщины без патологии беременности и 46 с диагнозом преэклампсия.

При исследовании содержания цистатина С в моче среди беременных оказались на I триместре беременности 9 женщин без патологии беременности и 4 с диагнозом вызванные беременностью отеки с протеинурией, на II триместре – 15 женщин без патологии беременности и 1 с диагнозом преэклампсия, на III триместре – 29 женщин без патологии беременности и 2 с диагнозом преэклампсия.

При исследовании активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче среди беременных оказались на I триместре беременности 44 женщины без патологии беременности и 6 с диагнозом существовавшая ранее гипертензия с присоединившейся протеинурией, на II триместре – 58 женщин без патологии беременности и 12 с диагнозом преэклампсия, на III триместре – 54 женщины без патологии беременности и 22 с диагнозом преэклампсия.

В работе были использованы растворы человеческого и бычьего сывороточного альбумина фирмы «Диа-М» (Россия) в концентрациях 0,01 – 0,5 г/л; растворы цистатина С фирмы «DiaSys» (Германия) в концентрациях 0 - 0,45 мг/л на основе изотонического раствора 0,9% NaCl, цельной и депротеинизированной мочи; образцы мочи с расчетной активностью NAG 0 - 7,72 Ед/л, приготовленные путем разведения мочи физиологическим

раствором; натрия хлорид, натрия гидроксид, лимонная кислота, бромфеноловый синий фирмы «Реахим» (Россия); р-нитрофенол, нитрофенил-п-ацетил-β-D-глюкозаминид (NAG), 2-амино-2-метил-1-пропанол гидрохлорид (AMP) фирмы «Sigma» (США).

Определение содержания общего белка в моче производили с использованием коммерческих наборов фирмы «Вектор Бест» (Россия), «Агат» (Россия), «High Technology Inc.» (США).

Горизонтальный нативный электрофорез в агарозном геле проводили с использованием автоматической системы SAS 1 и SAS 2 («HELENA LABORATORIES», Франция) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве контрольного материала по рекомендации фирмы производителя использовали нормальную сыворотку крови, разведенную в 10 раз 0,9% раствором NaCl. Учет результатов электрофореза проводили после сканирования пластинок с использованием программы PLATINUM («HELENA LABORATORIES», Франция).

Определение концентрации цистатина С в моче иммунотурбидиметрическим методом производили с использованием коммерческого набора фирмы «DiaSys» (Германия) для сыворотки крови.

Активность фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (NAG) в моче определяли спектрофотометрическим методом (Sato K., 1979). Анализ производили следующим образом. На фильтр хроматографической колонки наносили 1 мл исследуемой пробы и 5 мл физиологического раствора, собирали элюат в количестве 1 мл. Постановку ферментативной реакции производили по следующей схеме. В пробирку с холостой пробой (RB) вносили 0,5 мл физиологического раствора и 0,5 мл раствора NAG-субстрата; в пробирку со стандартом (S) – 0,5 мл раствора р-нитрофенола и 0,5 мл раствора NAG-субстрата; в пробирку для постановки контрольной пробы на цвет мочи (UB) - 0,5 мл элюата; в пробирку с исследуемым образцом (U) – 0,5 мл элюата и 0,5 мл раствора NAG-субстрата. Все пробирки инкубировали в течение 15 минут при температуре 37⁰С на водяной бане. После инкубации во все пробирки вносили 0,5 мл раствора AMP-буфера, в пробирку для постановки контрольной пробы на цвет мочи - 0,5 мл раствора NAG-субстрата. Оптическую плотность (E) образцов измеряли при длине волны 405 нм.

Величину активности NAG рассчитывали следующим образом:

$$\text{NAG, E/л} = (E [U - UB] / E [S - RB]) \times 7,5$$

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6 (StatSoft). В зависимости от результатов проверки вариационных рядов на нормальность (тест Шапиро-Уилка) использовались параметрические (t-тест Стьюдента, дисперсионный анализ) либо непараметрические методы (Манна-Уитни). Наличие различий между выборками не связанных между собой данных по количественному признаку проверяли с помощью критерия Краскела-Уоллиса. При p<0,05 проводили дополнительное попарное сравнение выборок с использованием критерия

Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования

Интерпретация результатов измерения содержания общего белка в моче беременных

В результате проведенного исследования были получены аналитические характеристики методов ПГК и ССК для определения общего белка в моче, представленные в таблицах 1, 2. В качестве калибраторов были использованы бычий сывороточный альбумин (БСА) и человеческий сывороточный альбумин (ЧСА).

Таблица 1

Результаты расчетов предела обнаружения по рекомендациям различных ассоциаций

Метод определения	ГОСТ-Р-ИСО-11843-2-2007*	ICH	IFCC / IUPAC
ССК, БСА	0,063 г/л	0,089 г/л	0,022 г/л** 0,019 г/л***
ПГК, БСА	0,058 г/л	0,021 г/л	0,027 г/л 0,032 г/л
ПГК, ЧСА	0,046 г/л	0,020 г/л	0,039 г/л 0,042 г/л

*- с учетом вероятностей ошибки первого и второго рода $\alpha=0,05$, $\beta=0,05$

** - концентрация аналита 0,05 г/л

*** - концентрация аналита 0,1 г/л

Таблица 2

Уровни систематической и случайной ошибки при определении БСА и ЧСА методами ССК и ПГК на уровне 0,05 и 0,1 г/л

Метод, белок	Концентрация белка, г/л	Систематическая ошибка (В), %	Коэффициент вариации (CV), %
ССК, БСА	0,05	9,1	19,01
	0,1	-7,0	8,86
ПГК, БСА	0,05	-9,0	15,89
	0,1	10,0	9,09
ПГК, ЧСА	0,05	0,2	11,80
	0,1	-0,1	7,75

Полученные оценки были сопоставлены с диагностическими пороговыми, референтными границами и биологической вариабельностью показателя. По данным Westgard QC, предельное значение коэффициента вариации (CV,%) для определения общего белка в моче составляет 19,8%, смещения (В,%) – 10,9% , общей ошибки (ТЕ,%) – 43,5%. То есть полученные аналитические характеристики как ССК-, так и ПГК-метода укладывались в рекомендованные

пределы. Вместе с тем рассчитанный согласно рекомендациям ГОСТ-Р-ИСО-11843-2-2007 и ICH предел обнаружения для ССК-метода оказался выше значения 0,033 г/л, на которое указывают в литературе как на диагностический порог. В то же время в случае ПГК-метода имеет место обратная ситуация, верхняя граница референтного интервала (0,120 г/л согласно рекомендациям производителя) кратно выше предела обнаружения вне зависимости от способа оценки показателя, что позволяет использовать его для определения низких концентраций общего белка в моче.

В ходе исследований было проведено сравнение результатов определения общего белка в моче при использовании калибраторов с различной представленностью альбуминов и глобулинов (рис. 1). Анализ полученных данных показал, что соотношение между пациентами с различными стадиями нефропатии существенно отличается в зависимости от варианта калибратора. Это приводит к перераспределению между пациентами, отнесенными к группе «норма» и «микропротеинурия»: Alb/G – 40/60 – 37,5% «норма» и 49,2% «микропротеинурия»; Alb/G – 70/30 – 19,5% «норма» и 65,6% «микропротеинурия» соответственно. Вместе с тем изменение состава калибратора не влияет на отнесение пациентов к группе «протеинурия» (13,2% Alb/G – 40/60 и 14,8% Alb/G – 70/30). Очевидно, что полученные результаты можно объяснить высоким сродством к альбумину красителя пирогаллолового красного.

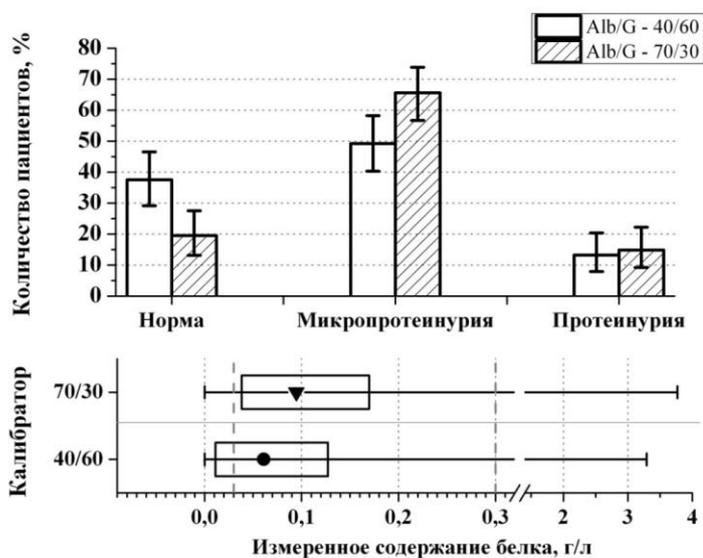


Рисунок 1. Зависимость распределения пациентов по измеренному содержанию общего белка в моче от состава калибратора.

Таким образом, результаты данного исследования указывают на существенную зависимость абсолютных значений результатов измерений от состава калибратора. Следовательно, также можно ожидать и наличие зависимости результатов от качественного состава мочи конкретного пациента. Однако эти различия могут заметным образом влиять на распределение пациентов между группами с нормальным содержанием общего белка и микропротеинурией. Следует отметить, что аналитические характеристики

ПГК-метода и высокое сродство красителя к альбумину позволяют обнаруживать белок в моче беременных уже на стадии микроальбуминурии.

В ходе работы было проведено сравнение взаимозависимости результатов определения общего белка в моче беременных методами ПГК, ССК, тест-полосок. Регрессионный анализ показал, что взаимосвязь между результатами анализа, выполненного тремя методами, весьма низка. Что находило отражение в рассогласовании отнесения женщин к той или иной категории протеинурии при использовании разных методов.

При оценке диагностических характеристик методов с учетом триместра беременности было установлено, что вышеуказанные методы определения общего белка в моче дают независимые результаты (рис. 2). При оценке методами ССК и на тест-полосках медианы распределения женщин с нормально протекающей беременностью были равны нулю во всех триместрах. При оценке же методом ПГК у женщин 1 триместра беременности медиана распределения была близка к диагностическому порогу 0,142 г/л и смещалась до значений 0,18 г/л во втором и третьем триместре. В группе женщин с диагнозом преэклампсия при оценке методом ССК смещение значений медиан распределения было незначительным. Медианы распределения по результатам анализа на тест-полосках и методом ПГК составили 0,15 г/л и 0,26 г/л во втором триместре; 0,15 г/л и 0,28 г/л в третьем триместре соответственно.

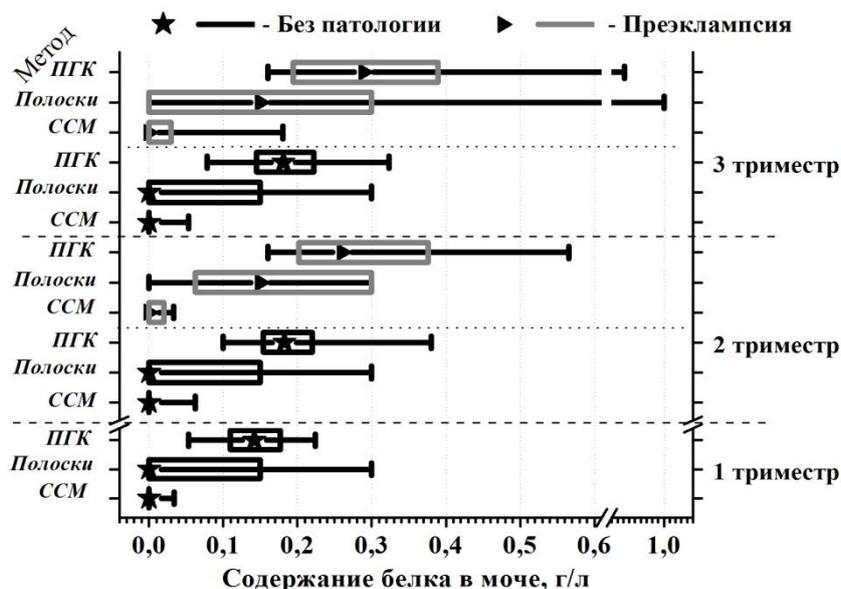


Рисунок 2. Распределение беременных по уровню общего белка в моче, определенного методами с использованием пирогаллолового красного (ПГК), сульфосалициловой кислоты (ССК), диагностических тест-полосок.

При анализе рассчитанных нами диагностических характеристик тестов было установлено, что достижение 100% чувствительности метода возможно лишь при 20% специфичности. При этом диагностическая значимость положительного результата во втором триместре составляет лишь 56% при диагностической значимости отрицательного результата 100% при уровне общего белка в моче, равном 0,145 г/л. В то время как диагностическая значимость положительного результата в третьем триместре составляет 61%

при диагностической значимости отрицательного результата 100% при уровне общего белка в моче, равном 0,16 г/л.

Учитывая полученные результаты, следует сместить верхнюю границу референтного интервала концентрации общего белка в моче беременных с 0,120 г/л до 0,150 г/л. Таким образом, целесообразно изменение референтного интервала концентрации общего белка мочи, что приведет к уменьшению числа дополнительных визитов беременных в женскую консультацию и к очевидной экономии материальных ресурсов.

Исследование белкового спектра мочи беременных

При электрофоретическом исследовании белков мочи были проанализированы 257 образцов мочи беременных (концентрация общего белка 0,1 – 1,5 г/л), для которых удалось получить 66 денситограмм (25,7%), пригодных для количественного анализа. Анализ электрофореграмм беременных без патологии показал, что альбуминовая фракция проявляется в 59,1% случаев, α_1 -глобулиновая – в 30,6% случаев, α_2 -глобулиновая – в 24,4% случаев, β -глобулиновая – в 55,1%, γ -глобулиновая – в 36,7%. Следует отметить, что при изучении патологических денситограмм альбуминовая фракция проявлялась в 64,7% случаев, α_1 -глобулиновая – в 11,8% случаев, α_2 -глобулиновая – в 52,9% случаев, β -глобулиновая – в 58,8%, γ -глобулиновая – в 11,8% случаев (фракции белков мочи по электрофоретической подвижности соответствовали белкам сыворотки крови).

Так как общепринятое обозначение белковых фракций отображает клиническую картину для белков сыворотки крови, в ряде случаев на электрофореграммах образцов мочи нами были получены зоны, которые нельзя отнести к конкретной белковой фракции. Данные зоны были нами обозначены как α_2 -/ β -глобулиновая фракция (рис. 3).

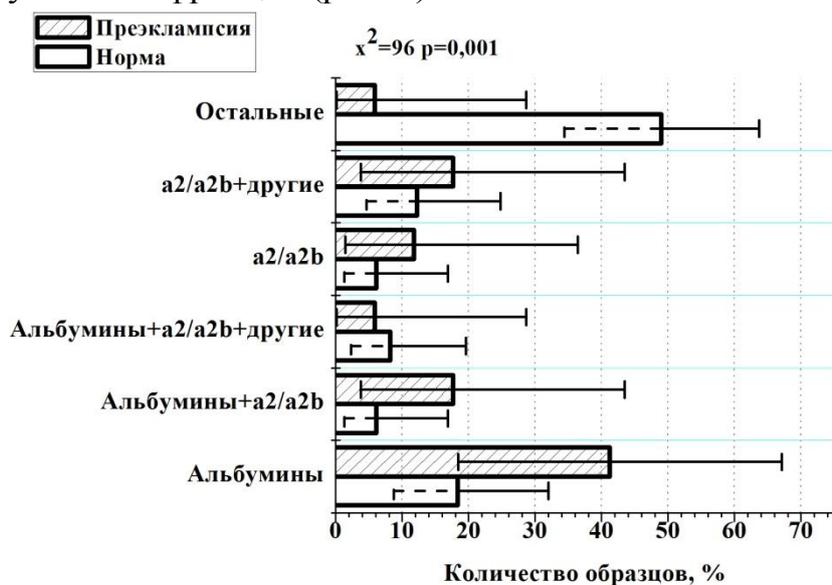


Рисунок 3. Распределение образцов мочи беременных по сочетанию белковых фракций.

Было установлено, что белки мочи беременных без патологии в 18,3% были представлены только альбуминовой фракцией; в 6,1% – альбуминовой, α_2 -/ β -глобулиновой фракцией; в 8,1% – альбуминовой, α_2 -/ β -глобулиновой и другими фракциями; в 6,1% – α_2 -/ β -глобулиновой фракцией; в 12,2% – α_2 -/ β -глобулиновой и другими фракциями; в 48,9% – остальными сочетаниями белковых фракций. В то время как у женщин с диагнозом преэклампсия в 41,1% проявлялась только альбуминовая фракция; в 17,6% – альбуминовая, α_2 -/ β -глобулиновая фракции; в 5,8% – альбуминовая, α_2 -/ β -глобулиновая и другие фракции; в 11,7% – α_2 -/ β -глобулиновая фракция; в 17,6% – α_2 -/ β -глобулиновая и другие фракции; в 5,8% – остальные сочетания белковых фракций (рис. 3).

При количественной оценке содержания белка во фракциях мочи статистически значимые различия были выявлены между альбуминовой и α_2 -глобулиновой фракциями. Кроме того, полученные результаты дискриминантного анализа указывают на то, что уровни α_2 - и α_2 -/ β -глобулиновой фракций столь же важны, как и уровень альбуминовой фракции.

Таким образом, было установлено, что протеинурия беременных обусловлена за счет альбуминовой, α_2 - и β -глобулиновой фракций. Следовательно, белки, входящие в состав α_2 - и β -глобулиновой фракций, могут являться потенциальными маркерами повреждения почек при преэклампсии.

Аналитические и клинические аспекты определения цистатина С в моче беременных

В результате проведенного исследования предел обнаружения цистатина С иммунотурбидиметрическим методом, рассчитанный в соответствии с рекомендациями ГОСТ-Р-ИСО-11843-2-2007, составил 0,039 мг/л; ICH - 0,076 мг/л; IFCC / IUPAC - 0,056 мг/л.

Для определения величины предела надежного обнаружения были использованы теоретический и эмпирический методы. При расчете предела надежного обнаружения теоретическим методом по ГОСТ величина количественного определения составила 0,23 мг/л. Для оценки этого показателя эмпирическим способом была использована зависимость коэффициента вариации от концентрации цистатина С в диапазоне 0,05 – 0,45 мг/л. При использовании данного подхода минимальная надежно обнаруживаемая концентрация оказалась, равной 0,17 мг/л.

Таким образом, было установлено, что данный метод может быть использован для определения цистатина С в моче. Полученные нами валидационные характеристики не противоречат данным для нефелометрического метода, рекомендуемого в литературе.

Для оценки влияния матрицы мочи на результат определения цистатина С было проведено измерение аналита в образцах, приготовленных путем разведения калибратора депротеинизированной и цельной мочой. Оказалось, что компоненты цельной мочи не влияют на линейность и коэффициент чувствительности метода. Смещение значений обусловлено белковыми компонентами цельной мочи.

При исследовании содержания цистатина С в моче оказалось, что статистически значимые корреляционные связи между уровнем цистатина С и общего белка в моче беременных отсутствуют ($p > 0,05$), т.е. эти показатели независимы.

Нами было установлено, что распределение беременных по уровню цистатина С оказалось асимметричным и не соответствовало критерию нормальности Шапиро-Уилка. Эта асимметрия была связана с высокой представленностью результатов (72,7%) ниже предела обнаружения (рис. 4). В данном случае использование значений средних неадекватно, а следовательно, более уместен непараметрический подход (оценка медиальных и перцентильных характеристик).

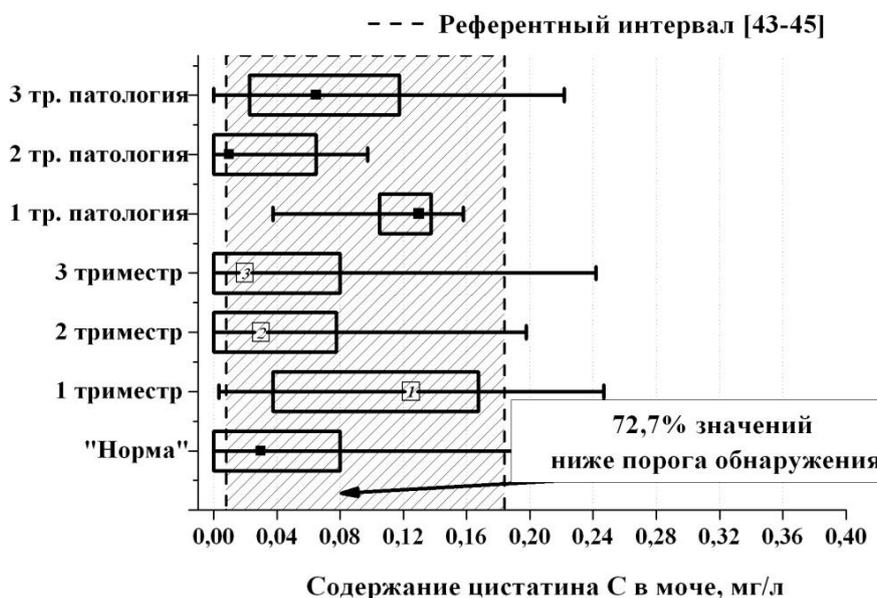


Рисунок 4. Распределение беременных по уровню цистатина С в моче с учетом диагноза в амбулаторной карте и триместра беременности.

При оценке медиальных характеристик в группе «норма» удалось установить, что медианы, полученные для II и III триместра беременности, оказались близки (0,02 и 0,03 мг/л соответственно) при смещении данной величины до 0,125 мг/л в I триместре. Вместе с тем значение 97,5%-ного перцентиля не превышало 0,246 мг/л.

Для группы женщин с указанием на патологию в обменной карте так же медианы для II и III триместра беременности были близки (0,01 и 0,065 мг/л соответственно) при смещении до 0,13 мг/л в I триместре. Следует отметить, что для группы «патология» III триместра характерна более высокая встречаемость женщин с содержанием цистатина С в интервале 0,08 - 0,12 мг/л. Значение 97,5%-ного перцентиля не превышало 0,221 мг/л. Таким образом, было установлено, что для беременных характерно увеличение содержания цистатина С в моче в I триместре. Получен референтный интервал цистатина С в моче для беременных, равный 0,17 - 0,25 мг/л.

Следует отметить, что выдвинутая нами гипотеза о повышении уровня цистатина С в моче беременных с преэклампсией не оправдалась. Нами не

были найдены диагностически значимые различия по содержанию α -цистатина С в группах беременных, следовательно, он не может быть использован в качестве маркера для ранней диагностики тубулопатий при преэклампсии.

Результаты определения активности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы в моче беременных

В результате проведенного исследования предел обнаружения активности NAG спектрофотометрическим методом, рассчитанный в соответствии с рекомендациями ГОСТ-Р-ИСО-11843-2-2007, составил 0,275 Ед/л; ICH - 0,244 Ед/л; IFCC / IUPAC - 0,636 Ед/л.

Величина предела количественного определения, рассчитанная согласно рекомендациям ГОСТ-Р-ИСО-11843-2-2007, составила 0,739 Ед/л.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что методика, предложенная К. Sato с соавт. [1979], может быть использована для определения активности NAG в моче. Следует отметить, что процедура пробоподготовки, предложенная автором, является весьма длительной и трудоемкой из-за необходимости приготовления и калибровки хроматографических колонок для получения элюата. Таким образом, данный этап работы требует внесения определенных модификаций.

При исследовании активности NAG в моче беременных были использованы два подхода расчета активности фермента (в перерасчете на 1 ммоль креатинина и без него). Нами была доказана необходимость расчета активности фермента в моче на 1 ммоль креатинина. По результатам корреляционного анализа не было выявлено достоверных различий между активностью N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы, общего белка и цистатина С. Распределение параметров во всех группах беременных отличалось от нормального, поэтому использовали непараметрический подход оценки верхней границы доверительного интервала.

При анализе полученных данных было установлено, что в группе женщин III триместра беременности и группе с диагнозом преэклампсия значения активности NAG превысили верхнюю границу референтного интервала в 18,2% и 12,5% случаев соответственно (рис. 5). В то время как все остальные группы оказались в границах интервала, указанного в литературных данных (Jacob M., 2006; Torbe A., 2014; Mohkam M., 2015).

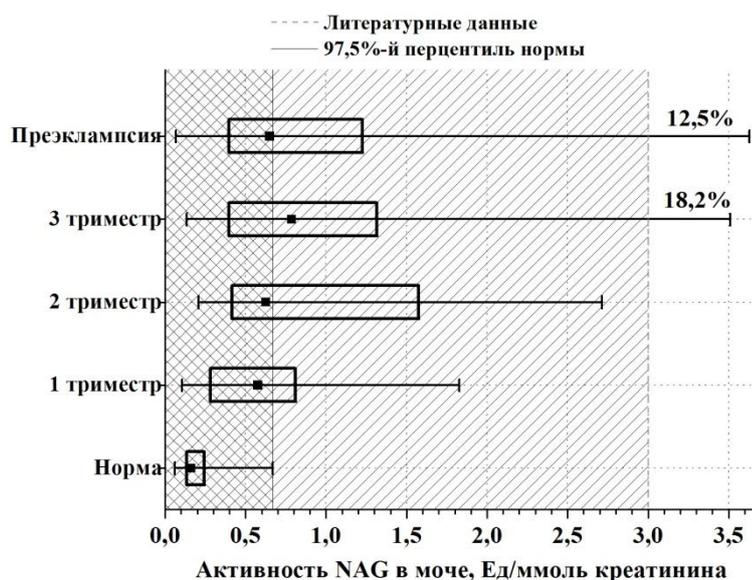


Рисунок 5. Распределение беременных по уровню активности NAG Ед/ммоль креатинина в моче с учетом диагноза в амбулаторной карте и триместра беременности.

Сравнение данных с привлечением медиальных оценок не выявило достоверных различий распределения по группам (по критерию Краскела-Уоллиса). Вместе с тем данные, приведенные на рисунке 9, указывают на увеличение медиальных оценок в группах женщин I, II и III триместра беременности, преэклампсия. Установлено, что медианы для группы женщин I, II триместра беременности и с диагнозом преэклампсия были близки и не превышали значения 0,67 Ед/ммоль креатинина (97,5%-ный перцентиль для группы норма). Следует отметить, что значение 97,5% перцентиля не превышало 3,51 Ед/ммоль креатинина для группы женщин III триместра беременности и 3,62 Ед/ммоль креатинина - преэклампсия (рис. 5).

Учитывая вышеизложенное, можно заключить, что спектрофотометрический метод может быть внедрен в лабораторную практику для определения активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче. Однако технологическая процедура требует некоторой модификации этапа пробоподготовки. Следует отметить, что для определения активности NAG в моче необходимо нормирование её уровня на концентрацию креатинина в моче.

Получен референтный интервал активности NAG в моче для беременных, равный 0,739 - 4,0 Ед/ммоль креатинина.

Изменение активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче женщин на протяжении всей беременности. В результате проведенного исследования было установлено, что активность NAG была достоверно выше ($p < 0,05$) в группе беременных женщин с преэклампсией, чем в группе норма (табл. 3).

Таблица 3

Активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче беременных женщин с учетом триместра беременности, Ед/ммоль креатинина (M±σ)

Обследуемые группы	I триместр*	II триместр*	III триместр*
Норма n=30	0,79 ± 0,25	0,84 ± 0,19	1,49 ± 0,63
Преэклампсия n=20	1,60 ± 0,89	2,09 ± 1,33	3,29 ± 0,82
Существовавшая ранее гипертензия с присоединившейся протеинурией n=6	2,99 ± 0,68	3,66 ± 0,58	3,8 ± 0,48

* p<0,05 по критерию Краскела-Уоллиса

Следует отметить, что наиболее значительное увеличение активности фермента наблюдалось у беременных с существовавшей ранее гипертензией с присоединившейся протеинурией уже на I триместре беременности. В дальнейшем у данных женщин имело место развитие преэклампсии во II и III триместре. Кроме того, у 2-х пациенток с эклампсией активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы достигала значений 4,65 и 5,09 Ед/ммоль креатинина соответственно.

Полученные нами результаты и данные, описанные в литературе, позволяют сделать вывод о том, что уровень активности NAG в моче является наиболее перспективным маркером повреждения клеток проксимальных канальцев почек, чем и-цистатин С. Так как NAG является лизосомальным ферментом, то повышение его активности – это результат непосредственного повреждения клеток тубулярного аппарата почек. Данный показатель может быть использован в качестве раннего маркера преэклампсии и тубулярного повреждения у беременных.

ВЫВОДЫ

1. Установлены аналитические характеристики колориметрического метода с использованием пирогаллолового красного для определения протеинурии: предел обнаружения - 0,02 г/л, что позволяет обнаруживать белок в моче беременных уже на стадии микроальбуминурии вне зависимости от триместра беременности.

2. Верхнюю границу референтного интервала концентрации общего белка в моче беременных, определенную колориметрическим методом с использованием пирогаллолового красного, следует принимать равной 0,150 г/л.

3. Установлено, что протеинурия беременных может быть обусловлена не только альбуминовой, но и α₂- и β-глобулиновой фракциями. Уровень глобулиновых фракций имеет важное диагностическое значение наряду с альбуминовой фракцией.

4. Установлены аналитические характеристики иммунотурбидиметрического метода определения содержания цистатина С в моче: предел обнаружения - 0,039 мг/л, предел количественного определения - 0,17 мг/л. Верхняя граница референтного интервала концентрации цистатина С в моче беременных, определенная адаптированной методикой, соответствует 0,25 мг/л.

5. Установлены аналитические характеристики спектрофотометрического метода определения активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче: предел обнаружения - 0,244 Ед/л, предел количественного определения - 0,739 Ед/л. Верхним пределом референтного интервала активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче для беременных можно принять величину, равную 4,0 Ед/ммоль креатинина.

6. N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза мочи является перспективным маркером тубулярного повреждения почек при преэклампсии, в то время как повышение концентрации цистатина С в моче беременных наблюдается только в I триместре.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Протокол клинико-аналитической валидации методик, включающий расчет аналитических характеристик и оценку референтных интервалов с биологической вариабельностью, рекомендуется для применения в клиническую лабораторную практику как один из этапов внедрения новых биохимических методик.

2. Использование ПГК-метода для определения общего белка в моче целесообразно для применения в целях скрининга преэклампсии и мониторинга за состоянием беременных. В качестве верхнего предела референтного интервала содержания общего белка в моче для беременных рекомендуется принять концентрацию, равную 0,150 г/л.

3. Использование электрофореза белков мочи может быть целесообразно для применения в целях ранней диагностики нефропатии у беременных.

4. Определение активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче рекомендуется для внедрения в клиническую лабораторную практику в качестве маркера тубулярного повреждения почек у беременных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах по перечню рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации

1. Желтухина, А.Н. Особенности интерпретации результатов измерения содержания белка в моче беременных женщин / А.Н. Желтухина, О.В. Островский, В.Е. Веровский // Клиническая лабораторная диагностика.- 2012.- №3.- С.14-15.

2. Преимущества динамической оценки качества измерений в клинико-диагностической лаборатории / А.М. Бондарев, В.Е. Веровский, О.В. Островский, Н.П. Мурзина, И.А. Нохашкиева, А.Н. Трифонова, Т.А. Фомина // Клиническая лабораторная диагностика.-2014.-№1.-С.62-65.

3. Трифонова, А.Н. Активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в моче беременных женщин / А.Н. Трифонова, О.В. Островский, В.Е. Веровский // Вестник ВолГМУ.-2015.-№2.- С.113-116.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов

4. Желтухина, А.Н. Клинический аудит определения белка в моче беременных женщин различными методами / А.Н. Желтухина, О.В. Островский // Клиническая лабораторная диагностика.- 2010.- №9.- С.56.

5. Желтухина, А.Н. Сравнительный анализ методов определения белка в моче у беременных женщин / А.Н. Желтухина // «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины»: Материалы 68-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием.- Волгоград, 2010.- С.28-29.

6. Определение аналитических характеристик автоматической системы для электрофореза белков SAS1/SAS2 / А.Н. Желтухина, Т.В. Фомина, В.Е. Веровский, О.В. Островский // Лаборатория.- 2010.- №2.- С.22.

7. Желтухина, А.Н. Оценка белкового спектра мочи беременных с различной степенью протеинурии / А.Н. Желтухина, О.В. Островский, В.Е. Веровский // Клиническая лабораторная диагностика.- 2011.- №10.- С.14.

8. Трифонова, А.Н. Аналитические и клинические аспекты интерпретации результатов определения белка в моче / А.Н. Трифонова, Т.В. Фомина // «Инновационные технологии в медицине XXI века»: Материалы Первой Всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков.- Москва, 2012.- С.321-322.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БСА	- бычий сывороточный альбумин
ПГК	- пирогаллоловый красный
ССК	- сульфосалициловая кислота
ТП	- тест-полоски
ЧСА	- человеческий сывороточный альбумин
Alb	- альбумин
В	- воспроизводимость
CV	- коэффициент вариации
ICH	- International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
IFCC	- International federation of clinical chemistry and laboratory medicine
ISO	- International Organization for Standardization
IUPAC	- International union of pure and applied chemistry
G	- глобулины
NAG	- n-ацетил- β -D-глюкозаминидаза
u	- urinary, мочево́й