

© М.М.Волков, И.М.Зубина, Е.Н.Левыкина, В.Н.Спиридонов, Е.Д.Суглобова, 2007
УДК 616.61-008.64-036.12-085.38:615.451.13]:615.844.6

М.М.Волков, И.М.Зубина, Е.Н.Левыкина, В.Н.Спиридонов, Е.Д.Суглобова

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ФОСФАТОВ В ОТРАБОТАННОМ ДИАЛИЗИРУЮЩЕМ РАСТВОРЕ

M.M.Volkov, I.M.Zubina, E.N.Levykina, V.N.Spiridonov, E.D.Suglobova

EXPERIENCE WITH USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR DETERMINATION OF THE CONCENTRATION OF PHOSPHATES IN THE USED DIALYZING SOLUTION

Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им.акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ. Оценка возможности применения метода капиллярного электрофореза для определения концентрации фосфатов в отработанном диализирующем растворе в процессе процедуры гемодиализа (ГД) как показателя Са-Р обмена. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследована группа больных из 7 человек (4 мужчины и 3 женщины; средний возраст – 54,5 ± 3,5 года), которые получали заместительную почечную терапию регулярным гемодиализом по поводу хронической почечной недостаточности (ХПН). Каждый больной получил на момент обследования в среднем 930 ± 240 сеансов гемодиализа. Больные условно были разделены на две группы по содержанию паратиреоидного гормона (ПТГ): I группа (3 человека) – с низким содержанием ПТГ, II группа (4 человека) – с высоким содержанием ПТГ. Для определения фосфатов использовали метод капиллярного электрофореза на приборе «Капель-103Р», предоставленном НПФ АП «Люмэкс». **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Уровень выводимого фосфата поддерживается практически постоянным на всем протяжении сеанса. По данным корреляционного анализа наиболее значимыми являются взаимосвязи суммарных показателей элиминации фосфата с концентрациями белковых компонентов плазмы крови, а также с активностью щелочной фосфатазы, которая характеризует степень резорбции костной ткани. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные данные о скорости элиминации фосфата имеют большое клиническое значение. Однако применение метода капиллярного электрофореза в данном эксперименте представляется слишком трудоемким и нерентабельным в отношении проведения массового обследования.

Ключевые слова: гемодиализ, фосфаты, капиллярный электрофорез.

ABSTRACT

THE AIM of the work was to assess the potential of using the method of capillary electrophoresis for determining the concentration of phosphates in the used dialyzing solution in the process of a hemodialysis (HD) procedure as an index of Ca-P metabolism. **PATIENTS AND METHODS.** A group of 7 patients (4 men and 3 women, mean age 54.5±3.5 years) was examined. They received substitution renal therapy with regular hemodialysis for chronic renal failure (CRF). Every patient received on average 930±240 sessions of HD at the moment of examination. The patients were divided into two groups according to the content of parathyroid hormone (PTH): I group (3 patients) with low content of PTH, II group (4 patients) with high content of PTH. Phosphates were determined by the method of capillary electrophoresis with the device "Kapel-103P" granted by company "Lumeks". **RESULTS.** The level of excreted phosphate was maintained practically constant during the whole session. The correlation analysis has shown that of greatest significance are the interrelations of summary indices of elimination of phosphate with the concentrations of blood plasma protein components, as well as with activity of alkali phosphatase that characterizes the degree of bone tissue resorption. **CONCLUSION.** The obtained data of the phosphate elimination rate are of great clinical value. However the application of the method of capillary electrophoresis in this experiment seems to be too laborious and uneconomic for using in mass examinations.

Key words: hemodialysis, phosphates, capillary electrophoresis.

ВВЕДЕНИЕ

Гемодиализ наряду с другими методами детоксикационной экстракорпоральной терапии – гемофильтрации и гемодиофильтрации – является безальтернативным вариантом замещающей почечной функции у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности. Однако заместительная почечная терапия (ЗПТ) вызывает целый ряд осложнений, приводящих к серьез-

ным нарушениям физиологических и антропометрических характеристик организма человека [1].

В 2000 г. в программной совместной работе ведущих мировых специалистов в области нефрологии и диализа «Millenium» одной из основных проблем, требующих первоочередного решения, была признана коррекция Са-Р обмена у больных с терминальной почечной недостаточностью, получающих ЗПТ [2].

Еще в начальных стадиях ХПН согласно теории Бриккера-Златопольского вследствие повреждения и гибели части нефронов возникает сначала транзиторная гиперфосфатемия, приводящая к снижению концентрации Са за счет непосредственного связывания последнего, а также – опосредовано – через подавление гидроксилирования $25(\text{ОН})\text{D}_3$ [3]. Таким образом, ретенция фосфата и уменьшение концентрации кальция стимулирует синтез и секрецию ПТГ. В результате действия ПТГ нормализуется уровень фосфатов и кальция (ионизированного), но при более высоких значениях ПТГ. По мере нарастания ХПН увеличивается задержка фосфатов, и гиперфосфатемия становится постоянной. Вследствие прогрессирования нефросклероза уменьшается образование активной формы витамина D_3 – кальцитриола, что способствует развитию гипокальциемии на фоне гиперфосфатемии. Возникающие нарушения регуляции Са-Р обмена являются предикторами развития вторичного гиперпаратиреоза, сопровождающегося образованием мягких кальцификатов и кальцификации мелких и крупных сосудов. В больших популяционных исследованиях установлена связь между концентрацией ПТГ сыворотки и смертности больных на ГД [4,5].

Частый забор крови для контроля показателей гемодиализа усугубляет анемию. Именно поэтому возможность мониторинга самого процесса диализа по количеству выводимого определяемого компонента становится весьма актуальной. Кроме того, известно, что в силу строения мембран диализаторов (они, как правило, несут на себе отрицательный заряд) элиминация фосфатов снижена. Хотя целевой концентрацией $[\text{PO}_4^{3-}]$ является 1,75 ммоль/л, содержание этого аниона в плазме крови больных в массе своей заведомо превышает этот показатель, и получающийся ионный градиент должен быть достаточно велик [6].

Количественное определение фосфатов в отработанном диализирующем растворе при отборе проб в динамике позволяет дать рекомендации по режиму профилирования гемодиализной процедуры. Оценка суммарного содержания выводимых фосфорсодержащих компонентов может также изменить диетологические предписания, разработанные для пациентов, получающих лечение хроническим гемодиализом.

Классическим методом лабораторного контроля концентрации фосфатов в биологических жидкостях его определение по восстановлению фосфорномолибденовой кислоты, однако чувствительность этой методики может быть и недостаточной для регистрации иона при соответствующих величинах его концентрации в отработанном диализа-

те. Поэтому была предпринята попытка применения метода капиллярного электрофореза, в настоящее время считающегося одним из наиболее перспективных сепарационных методов.

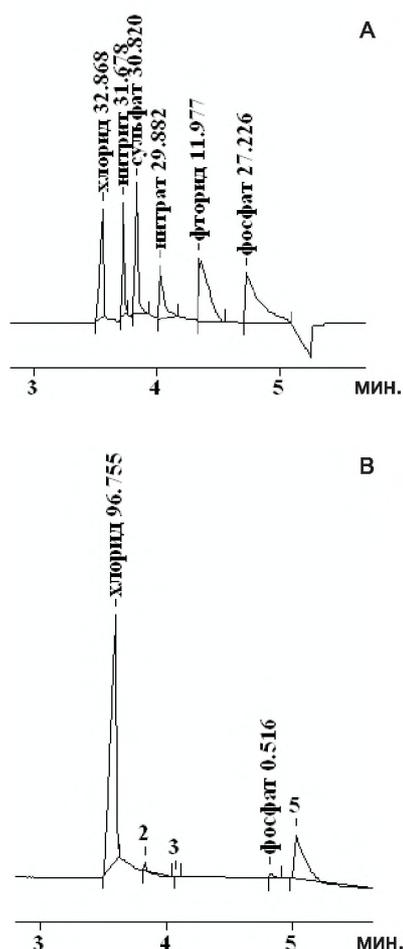
ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследована группа больных из 7 человек (4 мужчины и 3 женщины; средний возраст – 54,5 ± 3,5 года), которые получали заместительную почечную терапию регулярным гемодиализом по поводу хронической почечной недостаточности (ХПН). Каждый больной получил на момент обследования в среднем 930 ± 240 сеансов гемодиализа. К осложнению ХПН привели следующие заболевания: хронический гломерулонефрит – в 3 случаях, хронический пиелонефрит – в 2 случаях и поликистоз почек с вторичным пиелонефритом – в 2 случаях. Больные условно были разделены на две группы по содержанию паратиреоидного гормона: I группа (3 человека) – с низким содержанием, II группа (4 человека) – с высоким содержанием ПТГ.

Для определения фосфатов использовали метод капиллярного электрофореза на приборе «Капель-103Р», предоставленном НПФ АП «Люмэкс». Капиллярный электрофорез представляет собой метод разделения, реализуемый в капиллярах и основанный на различиях в электрофоретической подвижности заряженных частиц как в водных, так и в неводных буферных электролитах [7]. При работе нами была принята за основу сертифицированная методика определения анионов в сточных водах, разработанная НПФ АП «Люмэкс». Для адаптации ее к биологической жидкости, в нашем случае плазме крови, выполнялась пробоподготовка, заключающаяся в экспериментально подобранном разведении проб. По сравнению с обычно применяемыми методами анализа анионов в биологических жидкостях, такими как титрование, потенциометрия, капиллярный электрофорез обеспечивает необходимую точность и позволяет отказаться от длительного процесса пробоподготовки, а также использования специфической аппаратуры, если речь идет о решении подобных задач методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод измерения концентраций основан на получении электрофореграмм биологических жидкостей и сравнении их с калибровочными электрофореграммами смеси индивидуальных анионов на приборе капиллярного электрофореза.

В качестве ведущего электролита использовали буферный раствор следующего состава:

1,4 см³ раствора оксида хрома (VI) 0,05М, 2,0 см³ диэтанолamina 0,1М, 0,1 см³ глюконата кальция 0,025М, 4,5 см³ дистиллированной воды. К



Электрофореграммы модельных и реальных растворов. А – стандартный калибровочный раствор с концентрациями: хлорида, нитрита, сульфата, нитрата, фосфата по 30 мг/дм³ и фторида – 15 мг/дм³; Б – отработанный диализирующий раствор, разбавленный в 10 раз.

тщательно перемешанным компонентам добавляли 2,0 см³ гексадецилтриметиламмония гидроксида 0,01М. Сразу после смешения раствор фильтровали через мембранный фильтр в пластиковую посуду с закрывающейся крышкой. Раствор хранили при комнатной температуре и использовали в течение 1 недели.

Ежедневная промывка капилляра заключалась в последовательной промывке кислотой, водой, щелочью и снова водой по 2–3 минуты и затем раствором ведущего электролита в течение 7 минут.

Источником измерений служил отработанный диализирующий раствор, который отбирался из сливного отверстия АИП. Задачей исследования служила динамика изменения концентрации фосфатов за сеанс гемодиализа. Поэтому забор проб нами производился с определенной периодичностью. На первых этапах исследования мы брали пробы в момент подключения пациента к аппарату и затем через каждый час до окончания сеанса. В первые минуты после подключения в большинстве случаев происходит резкое изменение концентрации фосфата в пробе. Поэтому в дальнейшей работе мы отбирали пробы в следующем порядке: первую – до подключения к аппарату; вторую – в момент подключения и далее через каждые 10 минут в течение получаса, затем, как и в предыдущие разы, через каждый час.

Пробоподготовка образца диализирующего раствора заключалась в 50- либо 10-кратном разбавлении его дистиллированной водой и центрифугировании в течение 5–6 минут.

Пример электрофореграмм представлен на рисунке.

Следует отметить, к сожалению, что прибор «Капель 103Р» (из серии приборов «Капель», успешно применяемых для проведения серийных анализов) мало пригоден к исследовательской работе. Сам по себе метод оказался малоэффективным в рамках поставленной нами задачи; показания сильно зависят от температуры окружающей среды, но даже и при постоянной температуре время выхода электрофоретических пиков сдвигается в ходе работы прибора. Для быстрого анализа также есть ограничения: для отработки одной пробы (фактически это два последовательных опыта) требуется не менее 15–18 минут.

Таблица 1 РЕЗУЛЬТАТЫ

Выход фосфата в течение сеанса гемодиализа

Показатели	Среднее статистическое отклонение
Концентрация фосфата в 0 интервале времени	9,66 ± 4,30 мг/л
Концентрация фосфата в 30 минут	14,74 ± 2,32 мг/л
Концентрация фосфата в 60 минут	13,10 ± 2,16 мг/л
Концентрация фосфата в 120 минут	14,53 ± 2,31 мг/л
Концентрация фосфата в 180 минут	12,80 ± 1,25 мг/л
Интегральный выход фосфата за 0,5 часа	366,00 ± 82,02 мг*с/л
Интегральный выход фосфата за 1 час	783,64 ± 130,27 мг*с/л
Интегральный выход фосфата в интервале между 1 и 2 часом	828,86 ± 129,07 мг*с/л
Интегральный выход фосфата в интервале между 2 и 3 часом	819,86 ± 104,02 мг*с/л
Интегральный выход фосфата за 3 час	2432,36 ± 355,92 мг*с/л

Данные по количеству фосфата, выводимого в определенный момент времени в течение сеанса гемодиализа, приведены в табл. 1. Как следует из таблицы, уровень выводимого фосфата поддерживается практически постоянным на всем протяжении сеанса.

Для оценки значимости полученных данных проведен корреляционный анализ с некоторыми биохимическими показателями. Результаты корреляционного анализа представлены в табл. 2. Как видно из таб-

Корреляционное взаимодействие между суммарным выводом фосфатов и биохимическими показателями

Показатели	Коэффициенты корреляции Пирсона r(p)			
	общий белок, г/л	альбумин, г/л	ПТГ, пг/мл	щелочная фосфатаза, нМ/с
Концентрация фосфата в 0 интервале времени	-0,0960; p=0,838	-0,0617; p=0,895	0,6005; p=0,154	0,6281; p=0,131
Концентрация фосфата в 30-ю минуту	-0,7349; p=0,060	-0,4478; p=0,314	0,6220; p=0,136	0,5632; p=0,188
Концентрация фосфата в 60-ю минуту	-0,8897*; p=0,007	-0,7182; p=0,069	0,6286; p=0,131	0,6175; p=0,140
Концентрация фосфата в 120-ю минуту	-0,7410; p=0,057	-0,4105; p=0,360	0,3162; p=0,490	0,1813; p=0,697
Концентрация фосфата в 180-ю минуту	-0,6968; p=0,082	-0,4140; p=0,356	0,1746; p=0,708	0,1407; p=0,763
Интегральный выход фосфата за 0,5 часа	-0,3877; p=0,390	-0,2388; p=0,606	0,7368; p=0,059	0,7335; p=0,061
Интегральный выход фосфата за 1 час	-0,6623; p=0,105	-0,4491; p=0,312	0,7869*; p=0,036*	0,7663*; p=0,044*
Интегральный выход фосфата в интервале между 1 и 2 часом	-0,8454*; p=0,017*	-0,5817; p=0,171	0,4860; p=0,269	0,4080; p=0,364
Интегральный выход фосфата в интервале между 2 и 3 часом	-0,7452; p=0,055	-0,4229; p=0,344	0,2737; p=0,552	0,1716; p=0,713
Интегральный выход фосфата за 3 час	-0,8452*; p=0,017*	-0,5499; p=0,201	0,5999; p=0,154	0,5275; p=0,224

* обозначает достоверную корреляцию.

лицы, наиболее значимыми являются взаимосвязи суммарных показателей элиминации фосфата с концентрациями белковых компонентов плазмы крови, а также с активностью щелочной фосфатазы, которая характеризует степень резорбции костной ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ

Равномерный выход фосфатов в течение всей гемодиализной сессии на первый взгляд подтверждает представление о преимуществах длительных «отмывочных» процедур. Действительно, несмотря на массивированный вывод анионов их концентрация в плазме, тем не менее, остается настолько высокой, что на протяжении двух-трех часов суммарное содержание в отработанном диализате фактически не изменяется. Однако при корреляционном анализе достоверными оказались взаимосвязи интегрального вывода фосфатов за первый час процедуры гемодиализа и концентрации ПТГ и активности щелочной фосфатазы в плазме крови пациентов.

Сильные отрицательные корреляционные связи между выходом фосфатов и общей концентрацией белка в плазме крови не вполне понятны. Можно предполагать, что многозарядные анионы удерживаются в гидратной белковой оболочке, а в дальнейшем используются в анаболических системах, однако подобная гипотеза требует аккуратного экспериментального подтверждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные по элиминации фосфатов из организма пациента гемодиализа оказались в достаточной мере неожиданными. Возможно, они будут служить основой дальнейших исследований в области клинической лабораторной диагностики гемодиализа.

Выражаем глубокую благодарность руководству НПФ «Люмэкс», и в особенности Наталье Викторовне Комаровой, за предоставленную возможность ознакомиться с новыми лабораторными технологиями.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Nikolov I, Joki N, Druke T, Massy Z. Beyond phosphate – role of uraemic toxins in cardiovascular calcification. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(12): 3355-3357
2. Greca G, Klinkmann H, Valdtrabano F, Zucchelli P. From pathophysiology to clinical hemodialysis at the beginning of the next millennium. Introduction. *Kidney Int* 2000; 13(3): S1-S2
3. Slatopolsky E. The role of calcium, phosphorus and vitamin D metabolism in the development of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(3): S3-S8
4. Silver J. Molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15[Suppl 5]: S2-S7
5. Silver J, Yalcindag C, Sela-Brown A, Kilav R, Naveh-Manly T. Regulation of the parathyroid hormone gene by vitamin D, calcium and phosphate. *Kidney Int* 1999; 56 [Suppl 73]: S2-S7
6. Стецюк ЕА, Третьяков БВ, Калашников СВ. Коррекция гиперфосфатемии на гемодиализе. *Нефрология* 2004; 8(2):66-70
7. Комарова НВ, Каменцев ЯС. *Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель»*. ООО «Веда», СПб, 2006; 6

Поступила в редакцию 03.04.2007 г.
Принята в печать 07.06.2007 г.