

© В.А.Королев, О.В.Глушкова, Г.И.Гордеева, 2002
УДК [616.379-008.64:616.61]:547.963.4

В.А.Королев, О.В.Глушкова, Г.И.Гордеева

ГЛИКИРОВАННЫЙ ГЕМОГЛОБИН У БОЛЬНЫХ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИЕЙ

V.A.Korolev, O.V.Glushkova, G.I.Gordeeva

GLYCATED HEMOGLOBIN IN DIABETIC NEPHROPATHY PATIENTS

Кафедра терапии и гастроэнтерологии факультета последипломного обучения, кафедра факультетской терапии с курсом эндокринологии Крымского государственного медицинского университета им. С.И.Георгиевского, г. Симферополь, Республика Крым, Украина

РЕФЕРАТ

Целью работы было выявление взаимоотношений между уровнем гликированного гемоглобина (ГГ) и диабетической нефропатией (ДН). Было исследовано 20 больных сахарным диабетом (СД) с использованием метода тиобарбитуровой колориметрии с предварительным изоэлектрофокусированием HbA1c для определения ГГ.

У всех пациентов отмечался неадекватный уровень контроля или высокий сосудистый риск гликемии. У 14 больных наблюдалась микроальбуминурия (0,03-0,39 г/л), у 4 пациентов с ДН-протеинурия (>0,3 г/л) и 2 отмечалась хроническая почечная недостаточность. Во всей группе пациентов не найдено линейной корреляции, но обнаружена параболическая зависимость между уровнями ГГ и протеинурией ($y = -0.5667 + 0.1621x - 0.0065x^2$). Регрессионная ошибка D=3.4303.

Ключевые слова: патологический гемоглобин, заболевания почек, сахарный диабет.

ABSTRACT

The aim of the work was to determine the relationship of glycated hemoglobin (GH) and diabetic nephropathy (DN). We investigated 20 patients with diabetes mellitus (DM) and used the method of thiobarbituric colorimetry with preliminary isoelectrofocusing of HbA1c for the determination of GN. All the patients with DM had an inadequate level or high vascular risk of glucose control. In 14 patients there was microalbuminuria (0.03-0.39 g/l), 4 patients had DN with proteinuria (>0.3 g/l) and 2 patients had chronic renal insufficiency. All the patients did not have linear correlation but had a parabolic dependence between GH level and proteinuria ($y = -0.5667 + 0.1621x - 0.0065x^2$). The regression error D=3.4303.

Key words: pathological hemoglobin, renal illness, diabetes mellitus.

ВВЕДЕНИЕ

Диабетическая нефропатия (ДН) находится на пике распространенности [6], что определяет медицинское и экономическое значение проблемы и требует разработки путей ее решения [3]. При этом основным иницирующим метаболическим фактором является гипергликемия. В связи с этим представляется актуальным разработка предикторов ДН, одним из которых является гликированный гемоглобин (ГГ). Установлено, что ГГ, наряду с повышенным артериальным давлением относится к ведущим определяющим факторам прогрессирования ДН [17], и входит в число существенных самостоятельных предикторов микроальбуминурии (МАУ) [13]. Хотя и не обнаружено ассоциации между HbA1c и началом МАУ или клинической нефропатией [8], однако выявлены повышение риска МАУ у пациентов с сахарным диабетом (СД) 1 типа (СД 1) со значением HbA1c 10,1% и уменьшение частоты ДН при снижении HbA1c менее 8,1% [18]. Поэтому подчеркивается важность тщательного гликемического контроля, особенно по уровню HbA1c для прогноза СД 1 с МАУ [10] (особенно со

средним уровнем 9%). А сочетание повышенного уровня HbA1c и МАУ – важный фактор риска кардиоваскулярной патологии при СД 2-го типа (СД 2) [11]. При наличии у пациентов уремии ГГ не рекомендуется для гликемического контроля [19]. В то же время риск хронической почечной недостаточности (ХПН) у больных СД возрастал в 2,7 раза при HbA1c > 9,0% по сравнению с нормогликемией [16].

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось установление связи между уровнем ГГ и ДН.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 20 больных СД с наличием ДН, находящихся на стационарном лечении в эндокринологическом отделении Крымской республиканской клинической больницы им. Н.А.Семашко. Среди обследованных 11 пациентов были с 1 типом заболевания и 9 со 2-м типом. Возраст обследованных составил от 16 до 66 лет, а длительность заболевания – от впервые выявленного до 30 лет. При постановке диагноза заболевания использовали современную классификацию СД [22], контрольные

параметры, предложенные European Diabetes Polisy Group [14, 15] и разделение ДН, принятое в России [2]. ГГ определяли колориметрическим методом с предварительным изоэлектрофокусированием (ИЭФ) HbA1c – метод «ИЭФ+Диабет-тест» [4], сущность которого заключается в следующем. Сначала готовят градиентные растворы. Для этого создают исходный трис-боратный буфер – к 1 литру дистиллированной воды добавляют 0,01 М борную кислоту (620 мг) и вносят трис ($C_4H_{11}O_3N$) до pH 7,8-8,0 (примерно 500-700мг). Затем готовят три раствора: раствор №1 – 4 мг рибофлавина и 0,04 мл теммеда добавляют к 100 мл исходного буфера; раствор №2 – 0,24 мл теммеда (тетразил-метилendiамина) и 24 мл раствора №1 добавляют к 600 мл исходного буфера, измеряют pH; раствор №3 – 45 мл раствора №2 добавляют к 55 мл глицерина (ЧДА или ХЧ), тщательно перемешивают, измеряют pH. Значения pH растворов №2 и №3 являются конечными точками графика, по которым определяли значения pH двух градиентных растворов для ИЭФ, соответствующих изоточке гликированного белка. Эти два градиентных раствора готовят путем титрования раствора №3 в раствор №2, соответственно в двух темных сосудах (по 50 – 100 мл). К градиентным растворам добавляют акриламид и метиленбисакриламид, соответственно 68 и 2,03 мг на 1 мл раствора. Темные сосуды с градиентными растворами подписывают (номер, pH, дата приготовления) и хранят при температуре +1 +4°С в холодной камере. Перед исследованием берут капилляры – стандартные (диаметр 1 мм, длина 60 мм). Заполняют капилляры сначала градиентным раствором с более щелочным pH, затем с более кислым pH.

В начале капилляра оставляют свободное место (примерно 1/5 часть капилляра) для внесения исследуемого материала. Осуществляют фотополимеризацию под лучами дневного света (не менее 5-6 часов) до образования гелей. Капилляры с полиакриламидным гелем вставляют в аппарат для электрофореза (использован аппарат ПЭФ-1 с резиновыми пробками с заранее проколотыми иглой отверстиями). Перед исследованием у пациента берут цель-

Таблица 1

Уровни ГГ, тощаковой, постпрандиальной гликемии и суточной экскреции белка у обследованных больных СД

Обследованные больные	Показатели			
	ГГ (%)	тощаковая гликемия, ммоль/л	постпрандиальная гликемия (пик), ммоль/л	СЭБ, г/л
Все больные СД (n=20)				
Средняя арифметическая	10,91	9,22	10,43	0,36
Средняя квадратическая	11,40	9,63	11,27	0,55
Коэффициент линейной корреляции (r) между уровнем ГГ		0,0363	0,154	0,0468
Больные СД 1-го типа (n=11)				
Средняя арифметическая	11,52	9,76	9,19	0,25
Средняя квадратическая	11,97	10,26	10,24	0,38
Коэффициент линейной корреляции (r) между уровнем ГГ		-0,225	0,334	-0,229
Больные СД 2-го типа (n=9)				
Средняя арифметическая	10,16	8,54	11,93	0,49
Средняя квадратическая	10,67	8,79	12,42	0,70
Коэффициент линейной корреляции (r) между уровнем ГГ		0,184	0,051	0,325

Таблица 2

Определение степенной функции между уровнями ГГ и СЭБ у обследованных больных СД

Linean function $a=(0,2914), [0,5073], \{-0,0896\}; b=(0,0062), [-0,0219], [0,056]$
 Giperbola function $a=(1,1801), [0,5047], \{0,7954\}; b=(0,2409), [0,2073], \{0,4004\}$
 Degree function $a=(0,0734), [0,1873], \{0,0093\}; b=(0,3805), [-0,1362], \{1,4558\}$
 Index function $a=(0,1128), [0,1149], \{0,0713\}; b=(1,0434), [1,0141], \{1,1331\}$
 Parabola function $a=(-0,5667), [4,4453], \{-3,3721\}; b=(0,1621), [-0,7057], \{0,6787\}; c=(-0,0065), [0,0275], \{-0,0267\}$

The mistakes of regression $D1=(3,4303), [0,8134], \{1,9974\}; D2=(3,4996), [0,8394], \{2,4109\};$
 $D3=(4,0627), [1,0153], \{2,4390\}; D4=(4,0652), [1,0349], \{2,5451\};$
 $D5=(3,3610), [0,3888], \{1,3545\},$

где a, b, c – параметры регрессии, D – достоверный коэффициент, () – все больные СД, [] – больные СД 1-го типа, { } – больные СД 2-го типа.

ную кровь и готовят гемолизаты любым способом.

Гемолизаты вносят в капилляры при помощи шприца на 2,0 или инсулинового, вставляют капилляры в аппарат для электрофореза, последний заполняют трис-боратным буфером, проводят ИЭФ не менее 14 часов при напряжении не менее 20 в/см и температуре +1 – +4°С (в холодильной камере). После проведения ИЭФ каждый капилляр извлекают из аппарата и растирают в ступке с 2 мл дистиллированной воды до получения однородной массы (для каждого растертого капилляра отдельная пробирка). Далее опыт проводят так же, как и диабет-тест.

Метод «Диабет-тест». Помещают 2 мл гемолизата в пробирку с притертой пробкой, приливают 1 мл 0,3 N щавелевой кислоты, перемешивают встряхиванием. Пробы помещают на 1 час на кипящую водяную баню. Охлаждают до комнатной температуры на воздухе.

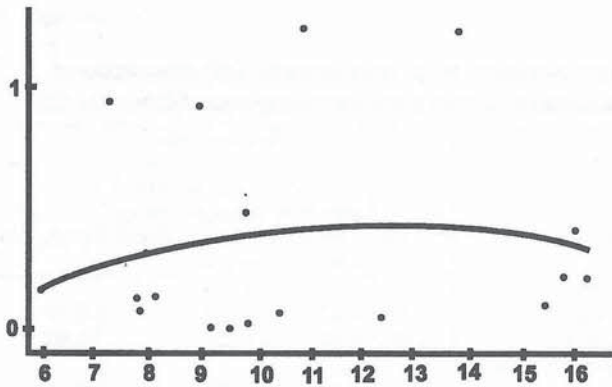


Рис. 1. Зависимость между уровнями ГГ в % (ось абсцисс) и СЭБ в г/л (ось ординат) у всех больных сахарным диабетом.

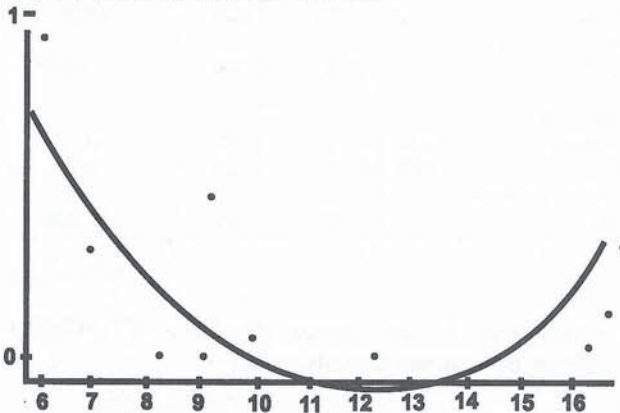


Рис. 2. То же у больных сахарным диабетом 1-го типа.

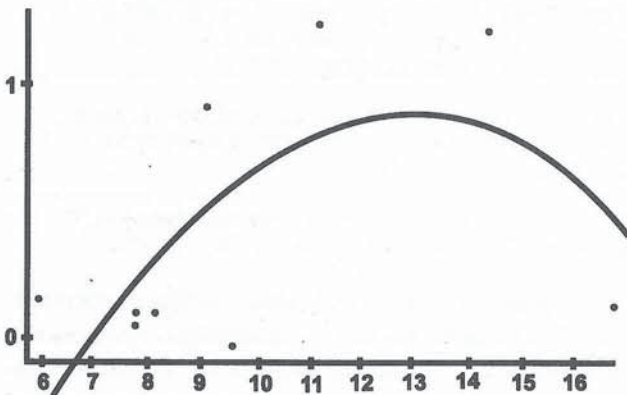


Рис. 3. То же у больных сахарным диабетом 2-го типа.

Приливают 1 мл 40% трихлоруксусной кислоты (ТХУ), перемешивают встряхиванием. Через 10 минут центрифугируют в течение 10 минут, 3000 об/мин. К 3 мл центрифугата приливают 0,75 мл 0,05 мл тиобарбитуровой кислоты /ТБК/, перемешивают встряхиванием. Инкубируют 40 минут при 40 градусах С на водяной бане. Колориметрируют на спектрофотометре при длине волны 443 нм против холостой пробы. Приготовление холостой пробы: 2 мл H_2O + 1 мл 0,3 N щавелевой кислоты + 0,75 мл 0,05 М ТБК – инкубировать вместе с опытными пробами. Расчет проводят по формуле:

E_{443}

$0,029 \times 3,3 = \% HbA_{1c}$,

где E_{443} – значение оптической плотности исследуемой пробы; 0,029 – значение оптической плотности, соответствующее 1% ГГ; 3,3 – коэффициент, учитывающий, что гидролиз неполный и осуществляется на 30%. Количество белка в моче определяли биуретовой реакцией [5]. Статистическую обработку полученных результатов проводили по разработанной нами программе, написанной на языке turbo Paskal с исчислением средней арифметической, средней квадратичной, проведением корреляционного и регрессионного анализов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Почти все обследованные больные СД с наличием ДН при поступлении в стационар по состоянию контроля глюкозы имели неадекватный уровень, либо же высокий сосудистый риск заболевания (табл. 1). При этом ДН в стадии МАУ (суточная экскреция белка (СЭБ) от 0,03 до 0,3 г/л) обнаружена у 14 пациентов, в стадии протеинурии и сохранной азотвыделительной функции почек (СЭБ > 0,3 г/л) – у 4 пациентов, в стадии хронической почечной недостаточности – у 2 обследованных. Не обнаружено статистически достоверной корреляции между уровнями ГГ и протеинурии у всех пациентов ($r=0,0468$), а также с СД 1 ($r=0,223$) и СД 2 ($r=0,324$). Однако при изучении характера изменения выраженности протеинурии в зависимости от изменения уровня ГГ обнаружена параболическая функция у всех больных, так как у этого вида регрессии была наименьшая ошибка анализа (табл. 2).

При этом уравнение регрессии у всех обследованных больных представлено как $y = 0,5667 + 0,1621x - 0,0065x^2$ (рис.1), у больных СД 1: $y = 4,4453 - 0,7057x + 0,0275x^2$ (рис.2), а у больных СД 2: $y = -3,3721 + 0,6787x - 0,0267x^2$ (рис.3). При изучении регрессии между уровнями тощачковой, постпрандиальной гликемии и уровнем ГГ степенная функция была также параболической, соответственно: $y = 3,4619 + 1,6554x - 0,0842x^2$, $D=209,5958$; $y = 29,47 + 0,4800x - 0,0113x^2$, $D=205,5385$.

ОБСУЖДЕНИЕ

При подборе больных с ДН мы исходили из заключения Miako Public Health Center [19] о том, что совместное использование гликемии и HbA_{1c} с учетом метода его определения [1] может быть полезно для идентификации групп с высоким риском микрососудистой патологии, так как доказано, что плохой гликемический контроль является одним из ведущих факторов риска появления персистирующей МАУ у больных СД 1 (наряду с преждевременным повышением АД и курением) [9], а у больных СД 2 $HbA_{1c} > 7,0-7,5$ – существенный

фактор риска ДН от МАУ к протеинурии [11]. Нам представилось это особенно важным, потому что большинство обследованных больных имели ДН именно в стадии МАУ. Отсутствие линейной корреляции между уровнями ГГ и протеинурии у обследованных с ДН согласуется с другими исследованиями и можно объяснить тем, что первый отражает исключительно состояние гомеостаза глюкозы, а в механизмах развития ДН наряду с метаболическими механизмами (гипергликемия, гиперлипидемия) существенную роль играют и гемодинамические (внутриклубочковая гипертензия и артериальная гипертензия) [7]. В то же время некоторое усиление этой связи, хотя и статистически недостоверной ($p > 0,005$), у больных СД 2 подтверждает особую ценность ГГ при данном заболевании [11], имеющем особый вид метаболизма [6]. При этом, как правило, отмечается более сильная корреляционная связь между уровнями ГГ и показателями обмена веществ [20]. Взаимосвязь изменения ГГ и протеинурии подтверждена нами проведением регрессионного анализа, доказывающего, что развитие ДН связано с динамикой уровня ГГ параболической функцией. Наличие схожей функции между изменением ГГ, тощаковой и постпрандиальной гипергликемии свидетельствует об особой важности гипергликемии как ведущего механизма развития ДН и, следовательно, доказывает возможность использования ГГ в качестве предиктора альбуминурии у больных СД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований по изучению влияния ГГ на развитие ДН можно заключить, что на фоне неудовлетворительного метаболического контроля у больных СД между уровнем ГГ и развитием ДН устанавливается нелинейная связь параболического характера, проявляющаяся тем, что изменения в содержании указанного индекса гликемии сопровождаются изменениями в количестве суточной протеинурии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гордеева Г.И., Королев В.А. Контроль диабетической нефропатии // Нефрологический семинар, 2001. – Сб. науч. тр. СПб нефрологического семинара, 18-21 июня 2001, СПб, ТНА, 2001 – с. 123-124.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия. – М.: «Универсум Паблшинг», 2000.
3. Добронравов В.А. Диабетическая нефропатия: эпидемиология, диагностика, течение, особенности почечных функций, прогноз, подходы к терапии. – Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб, 2000. – 35с.

4. Королев В.А., Головская, Белокурено В.П. и др. Оценка колориметрического метода определения гемоглобина А1с / Клини. лаб. диагн. – 2001. – №12. – С. 12-14.
5. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др.; Под ред. В.В. Меньшикова – М.: Медицина, 1987, – 368с.
6. Раков А.П. Роль различных вариантов нарушений углеводного обмена и тканевой инсулинорезистентности в формировании сердечно-сосудистой патологии. Дис. ... д-ра мед. наук. – СПб, 1990.
7. Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия: итоги XX века, перспективы XXI века // Сахарный диабет. – 2000. – №1. – С. 15-18.
8. Agardh CD., Agardh E., Torffvit O. The association between retinopathy, nephropathy, cardiovascular disease and long-term metabolic control in type 1 diabetes mellitus: a 5 year follow-up study of 442 adult patients in routine care // Diab. Res. Clin. Pract. – Vol. 35. – N. 2-3. – P. 113-121.
9. Anonymous. Risk factors for development of microalbuminuria in insulin dependent diabetic patients: a cohort study. Microalbuminuria Collaborative Study // Brit. Med. J. – 1993. – Vol. 306 (6887). – P. 1235-1239.
10. Bojestig M., Arnqvist H.J., Karlberg B.E., Ludvigsson J. Glycemic control and prognosis in type I diabetic patients with microalbuminuria // Diabetes Care. – 1996. – Vol. 19. – N. 4. – P. 313-317.
11. Bruno G., Cavallo-Perin P., Barger G. et al. Prevalence and risk factors for micro- and macroalbuminuria in an Italian population-based cohort of NIDDM subjects // Diabetes Care. – 1996. – Vol. 19, N. 1. – P. 43-47.
12. Gebre-Yohannes A., Rahlenbeck S.I. Glycaemic control and its determinants in diabetic patients in Ethiopia // Diab. Res. Clin. Pract. – 1997. – Vol. 35, N. 2-3. – P. 129-134.
13. Gonzalez-Clemente J.M., Esmatjes E., Navarro P. et al. Microalbuminuria development in short-term IDDM // Diab. Res. Clin. Pract. – 1994. – Vol. 24, N. 1. – P. 15-23.
14. Guidelines for Diabetes Care. A desktop guide to type 2 diabetes mellitus. European Diabetes Policy Group. 1998-1999.
15. Guidelines for Diabetes Care. A Desktop Guide to Type 1 Diabetes Mellitus. EDPG, 1998.
16. Hsu C.Y., Bates D.W., Kuperman G.J. et al. Diabetes, hemoglobin A(1c), cholesterol, and the risk of moderate chronic renal insufficiency in an ambulatory population // Am. J. Kidney Dis. – 2000. – Vol. 36, N 2. – P. 272-281.
17. Kohler S.M., Kramer B.K. Current therapeutic management of diabetic nephropathy // Acta Diabetologica. – 1994. – Vol. 31, N 3. – P. 119-125.
18. Krolewski A.S., Laffel L.M., Krolewski M. et al. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus // New Engl. J. Med. – 1995. – Vol. 332, N 19. – P. 1251-1255.
19. Morgan L., Marenah C.B., Jeffcoate W.J., Morgan A.G. Glycated proteins as indices of glycaemic control in diabetic patients with chronic renal failure // Diab. Med. – 1996. – Vol. 13, N 6. – P. 514-519.
20. Prendergast C., Smyth O., Murray F. et al. The relationship of blood glucose and haemoglobin A1 levels in diabetic subjects // Ir. J. Med. Sc. – 1994. – Vol. 163, N 5. – P. 233-235.
21. Takahashi Y., Noda M., Tsugane S. et al. Prevalence of diabetes estimated by plasma glucose criteria combined with standardized measurement of HbA1c among health checkup participants on Miyako Island, Japan // Diabetes, Care. – 2000. – Vol. 23, N 8. – P. 1092-1096.
22. World Health Organization Definition and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, 1999. – 59p.

Поступила в редакцию 11.03.2002 г.