

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2001

УДК 616.379-008.64-06:616.61]-07:616.633.45

И. А. Бондарь, В. В. Климонтов, Г. А. Пауль, С. М. Амбросова, Т. А. Короленко

ЭКСКРЕЦИЯ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ С МОЧОЙ У БОЛЬНЫХ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИЕЙ

Кафедра эндокринологии (зав — проф. И. А. Бондарь) Новосибирской государственной медицинской академии, Новосибирский областной диагностический центр

Цель исследования состояла в изучении количества и фракционного состава сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ) в моче у больных сахарным диабетом (СД) с различной выраженностью диабетической нефропатии (ДН). Обследовано 55 больных СД (в том числе 46 с СД типа 1 и 9 с СД типа 2) и 25 здоровых лиц. Обнаружено значительное (в 2,5 раза по сравнению с контролем) повышение суммарной экскреции ГАГ у больных СД, положительно коррелировавшее с показателями гликемического контроля. Наибольшее содержание ГАГ в моче выявлено в группах больных с ДН. Фракционный состав ГАГ зависел от стадии нефропатии. У больных без ДН, как и у здоровых людей, основной фракцией ГАГ мочи являлся хондроитинсульфат. У больных с начальной ДН в 90,3% случаев обнаружено повышение экскреции гепарансульфата и в 23,3% случаев — дерматансульфата. В группе больных с протеинурией повышенная экскреция данных фракций наблюдалась в 91,7 и 25% случаев соответственно. Полученные данные свидетельствуют о значительных нарушениях обмена ГАГ-содержащих протеогликанов у больных СД и позволяют предполагать вклад этих нарушений в развитие нефропатии. Исследование фракционного состава ГАГ мочи может использоваться в ранней диагностике ДН.

The urine content and fraction composition of sulfated glycosaminoglycans (GAG) were studied in 55 diabetics (48 with type 1 and 9 with type 2 diabetes) with different stages of diabetic nephropathy (DN) and 25 donors. A marked increase (2.5 times) of GAG excretion was revealed in diabetics. Urinary GAG level and glycemic control values were in positive correlation. Urinary GAG levels were the highest in the patients with DN. GAG fraction composition depended on the nephropathy stage. In patients without DN, like in healthy controls, the basic GAG fraction was chondroitine sulfate. In patients with initial DN heparan sulfate excretion was increased in 90.3% and dermatan sulfate excretion in 23.3% cases. In the group with proteinuria the excretion of these fractions was observed in 91.7 and 25% patients, respectively. These results indicate essential disorders in GAG-containing proteoglycane metabolism in diabetics and suggest that these disorders contribute to development of nephropathy. Study of urinary GAG fractions can be used in early diagnosis of DN.

Частота развития почечной недостаточности у больных сахарным диабетом (СД) остается чрезвычайно высокой и, по данным большинства исследований, достигает 25—30% [11]. Известно, что изменения в почках у больных СД обнаруживаются задолго до появления клиники диабетической нефропатии (ДН). Поэтому актуальны изучение патогенеза начальных стадий ДН и разработка методов ее доклинической диагностики.

Морфологическими методами установлено, что наиболее ранние и патогномичные для ДН изменения развиваются в базальных мембранах и мезангии клубочков [12]. Важнейшими биохимическими компонентами этих структур являются протеогликианы — комплексные соединения гликозаминогликанов (ГАГ) и белков. Функциональная роль протеогликанов состоит в обеспечении нормальной проницаемости почечного фильтра, создании отрицательного заряда эндотелия, регуляции роста гладкомышечных клеток сосудов [7]. Показано, что при СД наблюдаются нарушения синтеза ГАГ в клубочках почек [5, 20], изменяется нормальный состав ГАГ и соответствующих им протеогликанов в базальных мембранах [9, 18]. Степень этих изменений зависит от выраженности ДН.

Известно, что нарушения метаболизма почечных протеогликанов сопровождаются изменениями количества и состава ГАГ, экскретируемых с мочой [2, 20]. В связи с этим исследование гликозаминогликаноурии предложено в качестве теста для диагностики и мониторинга заболеваний почек [13, 14].

В литературе имеются весьма противоречивые данные об изменениях экскреции ГАГ у больных СД: одни авторы выявили увеличение данного параметра [8, 10], другие, напротив, зафиксировали его снижение [15]. Недостаточно изучена взаимосвязь изменений обмена ГАГ с развитием ДН.

С учетом этого целью нашей работы явилось изучение количества и фракционного состава экскретируемых с мочой сульфатированных ГАГ у больных СД типов 1 и 2 на разных стадиях развития нефропатии.

Материалы и методы

Обследовано 55 больных СД (30 мужчин и 25 женщин) в возрасте от 16 до 63 лет (средний возраст $34,3 \pm 1,8$ года). 46 обследованных страдали СД типа 1, 9 — СД типа 2. Все пациенты получали инсулинотерапию. Длительность заболевания варьировала от 3 мес до 36 лет, составляя в среднем $9,8 \pm 1,1$ года. Большинство больных (46 человек) находилось в состоянии декомпенсации углеводного обмена. В исследование не включали больных, получавших в течение последнего года ГАГ-содержащие препараты (гепарины, сулодексид), а также пациентов с обострением сопутствующих заболеваний.

В зависимости от наличия и выраженности ДН больные были распределены на 3 группы: в 1-ю вошли больные с нормальной экскрецией белка с мочой, во 2-ю — пациенты с микроальбуминурией или протеинурией до 0,3 г/сут, в 3-ю — больные с

Клинико-лабораторная характеристика больных СД

Показатель	Группа больных		
	1-я (n = 12)	2-я (n = 31)	3-я (n = 12)
Пол, мужчины/женщины	8/4	14/17	8/4
Возраст, годы	31,4 ± 4,1	36,4 ± 2,4	30,7 ± 3,2
Длительность СД, годы	7,0 ± 2,8	8,8 ± 1,2	15,1 ± 2,2**
Hb A _{1c} , %	11,2 ± 1,3	12,1 ± 0,7	11,7 ± 1,2
АД систолическое, мм рт. ст.	128,3 ± 6,0	133,5 ± 4,9	137,9 ± 4,5
АД диастолическое, мм рт. ст.	78,8 ± 3,4	83,5 ± 2,5	84,2 ± 2,3

Примечание. Звездочки — достоверность ($p < 0,05$) различий: одна — с 1-й группой больных, две — со 2-й.

клинически выраженной ДН. Клинико-лабораторная характеристика обследованных представлена в таблице. Выделенные группы были сопоставимы по половому, возрастному составу и степени компенсации СД. Пациенты с выраженной нефропатией отличались большей длительностью заболевания и тенденцией к повышению систолического и диастолического АД.

Контрольную группу составили 25 человек (13 мужчин и 12 женщин), не имеющих хронических заболеваний и наследственной отягощенности по СД.

Комплекс обследования включал в себя определение гликемии глюкозооксидазным методом, уровня гликированного гемоглобина A₁ (Hb A_{1c}) хроматографическим методом с помощью наборов "Диабет-Тест" АО "Фосфосорб" (Россия)¹, клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции по клиренсу эндогенного креатинина, протеинурии стандартным методом с сульфосалициловой кислотой (троекратно). У больных без явной протеинурии исследовали альбуминурию иммунохимическим полуколичественным методом с помощью тест-полосок "Микраль-Тест-II" фирмы "Boehringer Mannheim" (Австрия).

Экскрецию суммарных сульфатированных ГАГ определяли в утренней порции мочи с помощью раствора алцианового синего 8 GX по методу E. Gold (1981) в разработанной нами модификации [1]. Результат приводили к величине экскретируемого креатинина и выражали в миллиграммах ГАГ на 1 ммоль креатинина. Фракционный состав ГАГ исследовали методом электрофоретического разделения на ацетат-целлюлозных мембранах в 0,1 М барий-ацетатном буфере (pH = 4,8) по C. Pennock (1976). Для этого предварительно выделяли ГАГ из мочи осаждением цетилпиридиния хлоридом с последующей очисткой переосаждением этанолом в присутствии солей калия. У 12 человек исследование уровня ГАГ проводили в динамике заболевания (дважды).

Статистическую обработку проводили с использованием стандартных методов вариационной статистики с помощью программы Biostat. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента

¹ Диапазон нормальных показателей при определении данным методом составляет 4,4—8%.

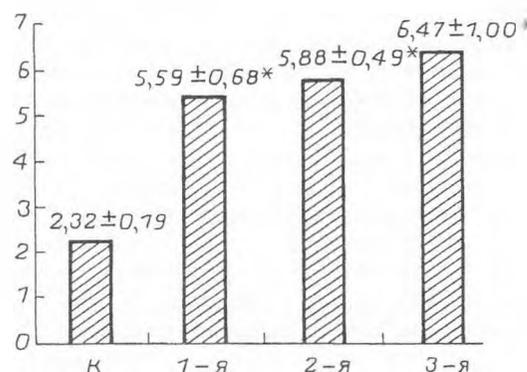
(с поправкой Бонферрони для множественных сравнений). Данные представлены как средние и ошибки их репрезентативности ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение

Проведенное исследование показало значительное (в 2,5 раза) увеличение суммарной экскреции с мочой сульфатированных ГАГ у больных СД по сравнению с контролем ($5,90 \pm 0,38$ и $2,32 \pm 0,19$ мг/ммоль креатинина соответственно; $p < 0,001$). Повышенная концентрация ГАГ в моче обнаружена у большинства пациентов: в 87,3% случаев показатель превышал верхнюю границу доверительного интервала в контроле ($1,39$ — $3,25$ мг/ммоль). Как видно на рисунке, гипергликозаминогликанурия наблюдалась у больных без признаков ДН. У больных с начинающейся и выраженной нефропатией гиперэкскреция ГАГ была еще более выражена. Эти данные подтверждают результаты работ, зафиксировавших повышение уровня ГАГ в моче у больных СД типов 1 [8] и 2 [10] с нефропатией.

Обнаружена зависимость экскреции ГАГ от степени компенсации СД. Наиболее высокие показатели наблюдали у больных с уровнем HbA_{1c} более 13%: $6,91 \pm 0,80$ мг/ммоль креатинина (при более низких значениях HbA_{1c} — $4,63 \pm 0,29$ мг/ммоль; $p < 0,05$). Проведенный корреляционный анализ выявил слабую положительную связь между экскрецией ГАГ и уровнем HbA_{1c} ($r = 0,35$; $p < 0,05$), а также среднесуточной гликемией ($r = 0,31$; $p < 0,05$). Исследование содержания ГАГ в динамике, проведенное с интервалом в 3 нед, показало, что краткосрочное улучшение компенсации углеводного обмена сопровождалось некоторым снижением гликозаминогликанурии, однако различия показателей при 1-м и 2-м обследовании не достигали степени статистической значимости ($p > 0,05$).

Не отмечено зависимости концентрации ГАГ в моче от типа СД, наличия ретинопатии и артериальной гипертензии.



Экскреция с мочой сульфатированных ГАГ у больных СД в зависимости от стадии ДН

По оси ординат — экскреция ГАГ (в мг/ммоль креатинина); по оси абсцисс — группы обследованных. К — контрольная группа. Звездочка — достоверное ($p < 0,001$) различие с контролем; различия между группами больных недостоверны ($p > 0,05$).

Для ответа на вопрос, какой вид ГАГ вносит наибольший вклад в увеличение суммарной экскреции данных веществ с мочой при СД, нами изучен фракционный состав ГАГ у обследованных больных и у лиц контрольной группы. У здоровых людей основным компонентом ГАГ мочи являлся хондроитинсульфат. У 6 (24%) из 25 человек контрольной группы наряду с хондроитинсульфатом присутствовал также гепарансульфат в качестве минорной фракции. Дерматансульфат и кератансульфат не выявлены ни в одном случае, что, очевидно, объясняется их крайне низкой (субпороговой) концентрацией в моче здоровых людей.

У большинства пациентов с нормальной экскрецией белка с мочой состав и соотношение фракций ГАГ существенно не менялись. Во всех случаях основным компонентом являлся хондроитинсульфат. Гепарансульфат присутствовал у 4 (25%) человек, причем у 2 в концентрации, близкой к концентрации хондроитинсульфата. Больные с начинающейся нефропатией характеризовались значительным увеличением экскреции с мочой гепарансульфата. Его наличие обнаружено у 28 (90,3%) больных 2-й группы, причем в 17 (54,8%) случаях гепарансульфат становился основной фракцией: его экскреция приближалась к таковой хондроитинсульфата или даже превышала ее. У 7 (23,3%) пациентов данной группы в моче обнаружен дерматансульфат. При выраженной ДН (3-я группа) гепарансульфат был выявлен у 11 (91,7%) из 12 больных, при этом у 7 (58,3%) больных в качестве мажорной фракции. В 4 (25%) случаях в заметных количествах экскретировался дерматансульфат.

Таким образом, у больных СД наблюдаются значительные количественные и качественные изменения экскреции с мочой сульфатированных ГАГ. По мере развития ДН возрастает как суммарная экскреция ГАГ, так и доля гепарансульфата в составе экскретируемых фракций. Это свидетельствует о глубоких изменениях метаболизма ГАГ-содержащих протеогликанов у больных СД, осложненным нефропатией.

Найденные нарушения, очевидно, могут быть связаны как с изменениями биосинтеза ГАГ, так и с повышением катаболизма ГАГ-содержащих комплексов. Обнаружено, что мезангиальные клетки при СД продуцируют намного больше ГАГ, особенно дерматансульфата, чем в норме. Выраженность этого нарушения усиливается с увеличением длительности диабета [5]. По мере развития ДН, как свидетельствуют эксперименты, в почках аккумулируются хондроитинсульфат и дерматансульфат [2]. Эти изменения могут иметь непосредственное отношение к формированию диабетического гломерулосклероза, так как известно, что накопление данных ГАГ — неотъемлемое звено патогенеза склеротических процессов.

Как показали наши исследования, наибольшие изменения при ДН претерпевает экскреция гепарансульфата. Повышенная концентрация этого вида ГАГ в моче была обнаружена и при других поражениях почек, протекающих с протеинурией [6, 13]. Гепарансульфатсодержащие протеогликаны, как известно, являются основным полианионным компонентом базальной мембраны клубочков, ко-

торый определяет ее отрицательный заряд и препятствует прохождению через почечный фильтр нейтрально и отрицательно заряженных молекул, в том числе молекул альбумина. Не удивительно поэтому, что снижение содержания гепарансульфата в составе базальных мембран приводит к повышению экскреции с мочой альбуминов, а затем и других белков.

Дефицит гепарансульфата в базальной мембране клубочков при ДН обнаружен в ряде исследований [7, 16]. По-видимому, данная аномалия носит универсальный характер: количество гепарансульфата снижается не только в клубочках почек, но и в капиллярах скелетных мышц [19] и кожи [17]. Причиной данного дефекта называют снижение активности N-ацетилазы — фермента, участвующего в биосинтезе гепарансульфата [3]. Обнаруженное нами высокое содержание гепарансульфата в моче больных с ДН позволяет выдвинуть и другое предположение: потеря гепарансульфата может быть следствием повышенного распада ГАГ-содержащих комплексов базальных мембран. Какова бы ни была причина потери гепарансульфата, результатом становится патологическая проницаемость почечного фильтра. Это, в частности, подтверждается тем, что препараты, содержащие гепарансульфат, а также близкий ему по структуре гепарин, дают отчетливый антипротеинурический эффект у больных с ДН [7].

Полученные данные свидетельствуют о том, что повышение экскреции гепарансульфата происходит уже на ранних (доклинических) стадиях ДН и наблюдается у больных с микроальбуминурией и, по-видимому, у части больных с нормоальбуминурией. В последнем случае гиперэкскреция гепарансульфата может указывать на наличие скрытой дисфункции гломерулярного аппарата. G. Gambaго и соавт. [4] удалось показать, что чрезмерное повышение экскреции альбумина с мочой у таких пациентов выявляется в условиях стимуляционной пробы с лизином. Вероятно, данная группа больных является угрожаемой по развитию нефропатии в дальнейшем и заслуживает проспективного наблюдения.

В заключение необходимо отметить, что у больных СД исследование экскреции сульфатированных ГАГ с мочой в силу своей чувствительности, доступности и неинвазивности может быть дополнительным методом при проведении скрининга и мониторинга функции почек. Необходимы дальнейшие исследования для определения подходов к терапевтической коррекции нарушений обмена ГАГ при СД.

Выводы

1. У больных СД типов 1 и 2 имеются нарушения метаболизма сульфатированных ГАГ, что проявляется значительным (в среднем в 2,5 раза) увеличением суммарной экскреции данных веществ с мочой.
2. Фракционный состав ГАГ мочи при СД зависит от стадии нефропатии. Развитие ДН характеризуется увеличением доли гепарансульфата и (реже) дерматансульфата в составе экскретируемых фракций.
3. Изменения фракционного состава сульфатированных ГАГ появляются на ранних (доклиниче-

ских) стадиях ДН и могут использоваться в их диагностике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пауль Г. А., Русова Т. В. // Клин. лаб. диагн. — 1995. — № 2. — С. 13—14.
2. Cadaval R., Kohlman O., Michelacci Y. // Glycobiology. — 2000. — Vol. 10, N 2. — P. 185—192.
3. Deckert T., Feltd-Rasmussen B., Kofoed-Enevolsen A. // Diabetologia. — 1989. — Vol. 32, N 3. — P. 219—226.
4. Gambaro G., Cicerello E., Mastro Simone S. et al. // Metabolism. — 1989. — Vol. 38, N 5. — P. 419—420.
5. Hadad S. J., Michelacci Y. M., Schor N. // Biochim. Biophys. Acta. — 1996. — Vol. 21, N 1. — P. 18—28.
6. Jadresic L. P., Filler G., Barratt T. M. // Kidney Int. — 1991. — Vol. 40, N 2. — P. 280—284.
7. Jensen T. // Diabetes. — 1997. — Vol. 46. — Suppl. 2. — P. S98—S100.
8. Kahaly G., Hansen C., Otto E. et al. // Exp. Clin. Endocrinol. — 1997. — Vol. 105, N 3. — P. 145—151.
9. Karasawa R., Nishi S., Suzuki Y. et al. // Nephron. — 1997. — Vol. 76, N 1. — P. 62—71.
10. McAuliffe A. V., Fisher E. J., McLennan S. V. et al. // Diabet. Med. — 1996. — Vol. 13, N 8. — P. 758—763.
11. Mogensen C. E. // Medicographia. — 1997. — Vol. 19, N 2. — P. 103—107.
12. Osterby R. // Diabetologia. — 1992. — Vol. 35, N 9. — P. 803—812.
13. Stefanidis I., Heintz B., Stocker G. et al. // J. Am. Soc. Nephrol. — 1996. — Vol. 7, N 12. — P. 2670—2676.
14. Tencer J., Torffvit O., Bjornsson S. et al. // Clin. Nephrol. — 1997. — Vol. 48, N 4. — P. 212—219.
15. Torffvit O., Rippe B. // Nephron. — 1999. — Vol. 83, N 4. — P. 301—307.
16. van den Born J., van Kraats A. A., Bakker M. A. et al. // Diabetologia. — 1995. — Vol. 38, N 10. — P. 1169—1175.
17. van der Pijl J. W., Daha M. R., van den Born J. et al. // Ibid. — 1998. — Vol. 41, N 7. — P. 791—798.
18. Vernier R. L., Steffes M. W., Sisson-Ross S., Mauer S. M. // Kidney Int. — 1992. — Vol. 41, N 4. — P. 1070—1080.
19. Yokoyama H., Hoyer P. E., Hansen P. M. et al. // Diabetes. — 1997. — Vol. 46, N 11. — P. 1875—1880.
20. Yokoyama H., Sato K., Okudaira M. et al. // Kidney Int. — 1999. — Vol. 56, N 2. — P. 650—658.

Поступила 28.11.2000

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 617.7+616.441-006.5-06:616.441-008.61]-078.33

Г. А. Герасимов, Н. А. Петунина, Т. Л. Павлова, Л. В. Трухина

РОЛЬ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРУ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ ТЕЧЕНИЯ ДИФFUЗНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ЗОБА И ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИИ

Кафедра эндокринологии (зав. — проф. М. И. Балаболкин) ФППО ММА им. И. М. Сеченова, Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Отдел офтальмоонкологии (зав. — проф. А. Ф. Бровкина) Московского НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Научный центр "ЭФИС", ВНИИФК

Диффузный токсический зоб (ДТЗ) и эндокринная офтальмопатия (ЭОП) являются аутоиммунными заболеваниями, чрезвычайно близкими по патогенезу. Наличие у больных с тиреотоксикозом ЭОП может служить клиническим маркером аутоиммунного генеза тиреотоксикоза. По данным разных авторов ДТЗ сочетается с ЭОП в 5—20% случаев [1, 9]. В то же время с помощью дополнительных визуализирующих методов (УЗИ орбит, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография) изменения в мягких тканях орбиты выявляются практически у 90% больных с ДТЗ [9]. Эти данные диктуют необходимость проводить многочисленные исследования по установлению механизма взаимосвязи этих двух заболеваний.

Наше исследование также посвящено этой актуальной проблеме и имеет целью изучить роль антител к рецепторам тиреотропного гормона (ТТГ) в диагностике и прогнозе ДТЗ и ЭОП.

ЭОП — аутоиммунное заболевание, проявляющееся патологическими изменениями в мягких тканях орбиты с вторичным вовлечением глаза, характеризующееся в разной степени выраженным экзофтальмом и ограничением подвижности глазных яблок; возможны изменения роговицы, диска зрительного нерва, нередко возникает внутриглазная гипертензия [2]. ЭОП диагностируют как при ДТЗ, так и при аутоиммунном тиреоидите, а также у пациентов без признаков заболеваний щитовидной железы (в зарубежной литературе эта форма обозначается как эутиреоидная болезнь Грейвса) [11].

Несмотря на то что аутоиммунная природа ЭОП доказана, не существует единого мнения относительно антигена, играющего ключевую роль в патогенезе этого заболевания. При ЭОП выявляются антитела к мембранам глазодвигательных мышц (с мол. массой 35 и 64 кД; антитела, стимулирующие рост миобластов) [8, 12], а также антитела к антигенам орбитальной клетчатки и эндотелия сосудов (теплошоковые протеины 72 кД, HLA-DR-антигены, межклеточные молекулы адгезии ICAM-1, молекулы сосудистой адгезии лимфоцитов, молекулы эндотелиальной адгезии лимфоцитов. Однако ключевым антигеном в патогенезе ЭОП большинство исследователей считают рецептор ТТГ и вырабатываемые к нему антитела [3, 4, 11]. Тиреоидстимулирующие антитела, связываясь с рецептором ТТГ на тироцитах, запускают иммунные реакции, в исходе которых лежат клинические проявления ДТЗ. Поскольку в 90% случаев при ДТЗ имеет место клинически выраженная или субклиническая ЭОП [9], проводились многочисленные исследования взаимосвязи этих двух заболеваний. У больных с ДТЗ и ЭОП отмечается высокий титр антител к рецептору ТТГ, который снижается на фоне тиреостатической терапии [4, 6].

В фибробластах орбиты при ЭОП обнаружена РНК, кодирующая внеклеточную часть рецептора ТТГ. Считается, что ген-кандидат расположен в области теломеры около гена, кодирующего рецептор ТТГ на 14q-хромосоме [4]. Авторы описывают точечную мутацию, в результате которой происхо-