

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРАДИЕНТНОЙ И АКТИВНОЙ РЕАБСОРБЦИИ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИИ ПЕРЕСАЖЕННОЙ ПОЧКИ

*Ермакова И.П., Бузулина В.П., Бородулин И.Э., Пронченко И.А., Томилина Н.А.*

ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва

На материале исследования 103 здоровых добровольцев проанализировано соотношение между минутными экскрециями кальция и натрия из 1 л клубочкового фильтрата (CaE/GFR, NaE/GFR) при NaE/GFR от 0,1 до 9,71 ммоль/л. Установлено, что соотношение описывается асимптотической кривой с  $r^2 = 0,54$ ;  $Y_x = 0,06 [1 - \exp(-x/2,34)]$ . Построена номограмма с доверительными интервалами (95%). Исходя из физиологических данных о двух механизмах реабсорбции кальция – градиентном (ГР) по градиенту, создаваемому реабсорбцией натрия, и активном (АР), – предложено на основе номограммы анализировать их состояние: ГР – на основании величины NaE/GFR, а АР – на основании направленности и степени отклонений от кривой у здоровых. Предложено количественно оценивать состояние АР реабсорбции кальция на основании Т-критерия (у здоровых  $-1,75 - +2,15$ ). Проанализировано состояние ГР и АР у 236 реципиентов трансплантированной почки.

*Ключевые слова: кальций, канальцевая реабсорбция кальция, трансплантация почки*

## ELABORATION OF METHOD FOR GRADIENT AND ACTIVE CALCIUM RENAL REABSORPTION DEFINITION FOR FUNCTIONAL ESTIMATION OF TRANSPLANTED KIDNEY

*Yermakova I.P., Buzulina V.P., Borodulin I.E., Pronchenko I.A., Tomilina N.A.*

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

The dependence between minute calcium and sodium excretion from 1 L glomerular filtrate (CaE/GFR; NaE/GFR) with NaE/GFR from 0,1 to 9,71 mmol/l GFR was studied in 103 health volunteers. There was received asymptotique curve with  $r^2 = 0,54$ ;  $Y_x = 0,06 [1 - \exp(-x/2,34)]$ . The nomogram with confidence intervals of 95% was built. On the basis of renal physiology it was offered differentiate gradual (to electrochemical gradiate created by sodium reabsorbtion) and active calcium reabsorbtion. It was assumed that gradual calcium reabsorbtion is equal to sodium reabsorbtion and may be estimate by NaE/GFR, CNa/GFR. We considered that active calcium reabsorbtion is normal if the correlation between CaE/GFR and NaE/GFR is inside being decreased if the correlation is higher and increased if the correlation is lower probable intervals. We proposed T-score CaE/GFR as the quantative parameter of active calcium reabsorbtion. It varied in health volunteers from  $-1,74$  to  $+2,15$ . The method was applied in 236 recipients of allotransplanted kidney.

*Key words: calcium, chanel calcium reabsorbtion, kidney transplantation*

Исследование функционального состояния пересаженной почки, и в частности процессов канальцевой реабсорбции, является основой неинвазивной диагностики структурных изменений в почечном трансплантате. При сохраненном гомеостазе каль-

ция состояние канальцевой реабсорбции кальция в современной литературе оценивают на основании его экскретируемой фракции [7]. Вместе с тем канальцевая реабсорбция кальция обеспечивается двумя процессами – пассивным и активным [11]. Со-

*Статья поступила в редакцию 10.10.09 г.*

**Контакты:** Ермакова Инна Петровна, ст. науч. сотр. лабораторно-диагностического отделения.

**Тел.:** (499) 190-24-30, **e-mail:** lab\_transpl\_nii@mail.ru

гласно постулатам физиологии почки, реабсорбция кальция: 1) в проксимальном канальце осуществляется исключительно по электрохимическому градиенту, создаваемому активной реабсорбцией натрия, в результате чего к концу проксимального канальца концентрация кальция в первичной моче остается такой же, как и в клубочковом ультрафильтрате; 2) в петле Генле является активной и не зависит от реабсорбции натрия; 3) в дистальном канальце складывается из пассивной, осуществляемой по электрохимическому градиенту, создаваемому реабсорбцией натрия, и активной, не связанной с реабсорбцией натрия, а гормонально регулируемой [7, 11]. Таким образом, градиентная реабсорбция кальция локализуется в проксимальном и дистальном канальцах, а активная – в петле Генле и в дистальном канальце. Вместе с тем методов отдельной количественной оценки состояния градиентной и активной реабсорбции кальция у человека в доступной нам литературе найти не удалось.

Целью работы явилась разработка методов количественной оценки градиентной и активной реабсорбции кальция у здорового человека и их применение в трансплантологии.

Задачи работы: 1) установить закономерность взаимосвязи между экскрецией кальция и натрия при большом диапазоне экскреции натрия у здорового человека и получить ее математическое выражение с доверительными интервалами; 2) разработать математические методы количественной оценки градиентной и активной реабсорбции кальция и 3) сопоставить информативность общепринятого и разработанных в настоящем исследовании методов оценки канальцевой реабсорбции кальция аллотрансплантированной почкой при ее удовлетворительной функции, хроническом отторжении и нефротоксичности циклоспорина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реабсорбцию кальция и натрия исследовали у 103 здоровых добровольцев в возрасте 20–40 лет без признаков заболеваний почек, находящихся на свободном режиме потребления кальция и натрия, а также у 236 реципиентов аллотрансплантированной почки (АТП) в возрасте от 13 до 57 лет в сроки от 1 до 147 месяцев после операции с нормальной концентрацией кальция в сыворотке крови и в ее ультрафильтрате. 183 реципиента были с удовлетворительной функцией трансплантата (УФТ), 34 – с хроническим отторжением (ХОТ) и 19 – с циклоспориновой нефротоксичностью (ЦиА-нт). 118 реципиентов получали трехкомпонентную (циклоспорин, преднизолон, азатиоприн) и 118 – двухкомпонентную (преднизолон и азатиоприн) иммуносупрессию. Характеристика здоровых

добровольцев и реципиентов аллотрансплантированной почки представлена в таблице.

В двух утренних одночасовых порциях мочи и в сыворотке крови, взятой утром натощак, определяли концентрации кальция на атомноабсорбционном спектрофотометре ИЛ-151 (Instrumentation Laboratory, США), натрия – на пламенном фотометре ИЛ-743 (Instrumentation Laboratory, США) и креатинина – фотометрически кинетическим методом на биохимическом анализаторе RA-2000 (Technikon, США). Концентрацию кальция определяли также в полученном анаэробно ультрафильтрате сыворотки крови [10]. Исходя из соответствующих концентраций и минутного диуреза, рассчитывали минутную экскрецию кальция (CaE), натрия (NaE) и клиренс креатинина (GFR). Для оценки состояния суммарной реабсорбции кальция и натрия общепринятыми методами рассчитывали минутную экскрецию кальция и натрия из 1 литра клубочкового фильтрата (CaE/GFR и NaE/GFR) и их экскретируемые фракции (CCa/GFR и CNa/GFR).

Кривую, описывающую бивариантную зависимость, подбирали на основании максимального квадрата коэффициента корреляции и минимального 95% доверительного интервала с помощью программы ТВС (США). Статистическую обработку полученных данных осуществляли в программе EPISTAT (США). Групповые результаты по всем исследуемым параметрам представляли в виде средней  $\pm$  среднееквадратичное отклонение от средней ( $M \pm SD$ ). Критический уровень значимости различия показателей принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные обследования 103 здоровых добровольцев свидетельствуют о том, что экскреция натрия из 1 л клубочкового фильтрата у них колеблется в широких пределах. Соотношение между экскрецией кальция и натрия из 1 л клубочкового фильтрата при большом диапазоне экскреции натрия у здоровых отражает рис. 1. Аналогичное соотношение между этими переменными, как оказалось, имеет место и у 125 онкологических больных с нормокальциемией без поражения почек на фоне в/в инфузии 0,9% раствора хлорида натрия в объеме 1–1,5 л [9], в связи с чем результаты этого исследования были также использованы нами в дальнейшем анализе. Математический анализ показал, что между экскрецией кальция и натрия из 1 л клубочкового фильтрата у здоровых и онкологических больных с нормокальциемией и сохранной функцией почек наблюдается экспоненциальная зависимость, описываемая уравнением  $Y_x = a [1 - \exp(-x/b)]$  с квадратом коэффициента корреляции 0,54;  $a = 0,06$ ;  $b = 2,34$ .

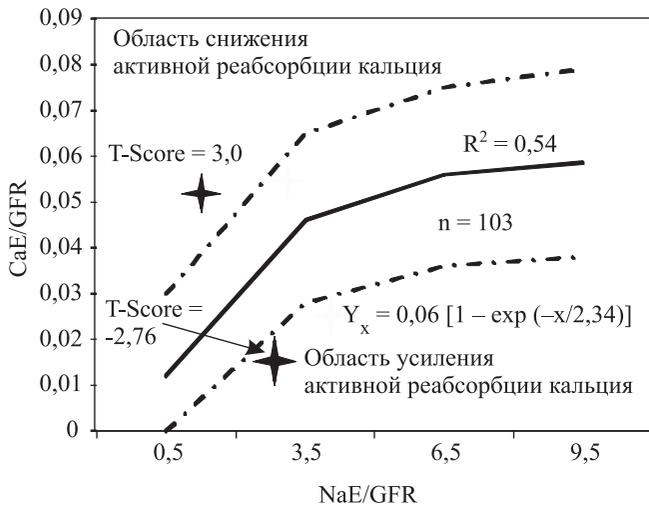


Рис. 1. Номограмма зависимости экскреции кальция от экскреции натрия с доверительными интервалами 95%

Такой характер кривой свидетельствует о том, что у здоровых в условиях повышенного потребления натрия прогрессивное снижение его реабсорбции и увеличение экскреции более 2 ммоль/л клубочкового фильтрата сопровождается снижением экскреции кальция, и суммарная реабсорбция кальция, таким образом, преобладает над реабсорбцией натрия. У здоровых величина суммарной реабсорбции кальция находится в пределах доверительных интервалов, включающих 95% экспериментальных значений, и состоит из суммы градиентной и активной реабсорбции [11]. Поскольку градиентная реабсорбция кальция (в проксимальных и частично в дистальных канальцах) осуществляется по электрохимическому градиенту, создаваемому реабсорбцией натрия, о ее состоянии можно, как нам представляется, судить по величине  $CNa/GFR$ , отражающей состояние реабсорбции натрия. В свою очередь, оценить состояние активной реабсорбции кальция, по нашему мнению, можно на основании отклонений в соотношении между экскрецией кальция и

натрия от описанной кривой. Величина отклонения этого соотношения в пределах доверительных интервалов будет указывать на нормальную активную реабсорбцию кальция, выше кривой – на снижение, а ниже кривой – на усиление активной реабсорбции кальция. Для количественной характеристики отклонений в активной реабсорбции кальция мы использовали T-критерий, применяемый для оценки отклонений от нормы некоторых биохимических показателей [8]. T-критерий – это количество стандартных отклонений, на которое индивидуальное значение  $CaE/GFR$  отклонялось от среднего значения  $CaE/GFR$  у здоровых при данной величине экскреции натрия. Вычисление производилось следующим образом: из конкретного значения  $CaE/GFR$  вычиталось среднее значение  $CaE/GFR$  в группе здоровых при данном значении  $NaE/GFR$ , и полученная разность делилась на одно стандартное отклонение  $CaE/GFR$  у здоровых. Оказалось, что у здоровых T-критерий  $CaE/GFR$  колеблется от  $-1,74$  до  $2,18$  и составляет в среднем  $0,22 \pm 0,98$ . Величина T-критерия  $CaE/GFR$  при доверительной вероятности 95% менее  $-1,74$  свидетельствует об усилении, а более  $2,18$  – об ослаблении активной реабсорбции кальция.

Применение разработанного нами метода оценки состояния активной и градиентной реабсорбции кальция в клинике позволило получить дополнительную информацию о состоянии канальцевого транспорта кальция. В частности, у большинства больных после аллотрансплантации почки выявлен дефект реабсорбции натрия (снижение  $CNa/GFR$ , таблица), свидетельствующий также и о снижении градиентной реабсорбции кальция [1–6]. Кроме того, оказалось, что степень дефекта градиентной реабсорбции кальция не зависит от характера иммуносупрессии и выражена больше при ХОТ, чем при УФТ (рис. 2, табл.). В то же время в отличие от ХОТ у подавляющего числа реципиентов с

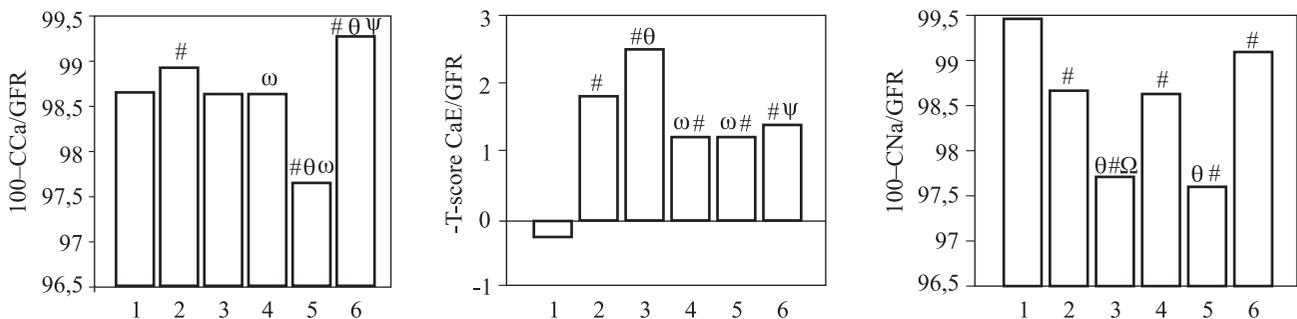


Рис. 2. Градиентная ( $100-CNa/GFR$ ), активная ( $-T-score CaE/GFR$ ) и суммарная ( $100-CCa/GFR$ ) реабсорбция кальция у здоровых (1), а также реципиентов аллотрансплантированной почки на фоне удовлетворительной функции трансплантата (2 – трехкомпонентная терапия; 4 – двухкомпонентная терапия); хронического отторжения (3 – трехкомпонентная терапия, 5 – двухкомпонентная терапия) и нефротоксичности циклоспорина (6). Условные обозначения: # – достоверное отличие от группы здоровых;  $\theta$  – достоверное отличие от удовлетворительной функции трансплантата;  $\omega$  – достоверное отличие от трехкомпонентной терапии;  $\psi$  – достоверное отличие от ХОТ;  $\Omega$  – достоверное отличие от нефротоксичности ЦиА

Таблица

**Показатели гомеостаза и функционального состояния (клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции кальция и натрия) трансплантированной почки**

Параметры	УФТ		ХОТ		ЦиА-нт	Здоровые
	ЦиА (+)	ЦиА (-)	ЦиА (+)	ЦиА (-)		
Возраст, годы	От 16 до 57 n = 78	От 13 до 54 n = 105	От 17 до 45 n = 21	От 18 до 50 n = 14	От 20 до 42 n = 19	От 18 до 40 n = 103
Рсг	0,1 ± 0,02 n = 78	0,1 ± 0,02 n = 105	0,26 ± 0,01** n = 21	0,24 ± 0,05** n = 14	0,18 ± 0,04** n = 19	0,1 ± 0,02 n = 103
GFR	51,9 ± 18,6# n = 78	79,5 ± 28,6 n = 105	27,0 ± 11,8** n = 21	36,4 ± 20,7 n = 14	37,3 ± 18,1** n = 19	96,3 ± 12,6 n = 103
CaUF	1,3 ± 0,1 n = 78	1,34 ± 0,09 n = 105	1,32 ± 0,08 n = 21	1,33 ± 0,11 n = 14	1,39 ± 0,07 n = 19	1,29 ± 0,1 n = 103
MgUF	0,55 ± 0,03 n = 78	0,54 ± 0,06 n = 78	0,56 ± 0,04 n = 21	–	0,55 ± 0,04 n = 19	0,54 ± 0,04 n = 59
Рр	1,0 ± 0,21 n = 78	0,91 ± 0,24 n = 105	1,17 ± 0,19 n = 21	0,94 ± 0,18 n = 14	1,08 ± 0,21 n = 19	1,09 ± 0,19 n = 64
ССа/GFR	1,1 ± 0,7 n = 78	1,40 ± 1,06 n = 105	1,39 ± 0,5* <sup>ω</sup> n = 21	2,36 ± 1,7# n = 13	0,7 ± 0,3# <sup>ψ</sup> n = 19	1,37 ± 0,66 n = 103
CNa/GFR	1,39 ± 0,8# n = 78	1,38 ± 0,9# n = 105	2,33 ± 1,0** n = 21	2,4 ± 1,5** n = 14	0,89 ± 0,61 <sup>ψ</sup> n = 19	0,53 ± 0,44 n = 63
T-score CaE/GFR	-1,8 ± 1,1# <sup>ω</sup> n = 78	1,2 ± 1,4# n = 105	-2,5 ± 0,93** <sup>ω</sup> n = 21	-1,2 ± 1,8# n = 14	1,4 ± 1,0# n = 19	0,23 ± 0,98 n = 103
T-score CNa/GFR	1,46 ± 1,25# n = 77	–	3,14 ± 1,6** n = 21	–	0,6 ± 0,9# <sup>ψ</sup> n = 19	0,01 ± 0,94 n = 71

Примечание. # – достоверное отличие от группы здоровых; \* – достоверное отличие от удовлетворительной функции трансплантата; <sup>ω</sup> – достоверное отличие трехкомпонентной терапии от двухкомпонентной; <sup>ψ</sup> – достоверное отличие от хронического отторжения трансплантата.

ЦиА-нт градиентная реабсорбция кальция остается сохранной. Снижение градиентной реабсорбции кальция у всех реципиентов АТП ассоциируется с усилением активной его реабсорбции, которое и при УФТ, и при ХОТ выражено в большей степени на фоне трехкомпонентной, чем двухкомпонентной иммуносупрессии. Более того, на фоне трехкомпонентной иммуносупрессии степень усиления активной реабсорбции кальция у пациентов с ХОТ значительно больше, чем у пациентов с УФТ. В то же время степень усиления активной реабсорбции кальция при ЦиА-нт меньше, чем при ХОТ, несмотря на аналогичную степень повышения креатинина в сыворотке крови и снижения клубочковой фильтрации. Вместе с тем анализ состояния реабсорбции кальция общепринятым методом (по величине ССа/GFR) при любой иммуносупрессии на фоне удовлетворительной функции трансплантата, как и на фоне нефротоксичности циклоспорина, не выявил отличий от здоровых. Лишь при хроническом отторжении трансплантата повышение экскретуруемой фракции кальция, более значительное при двух-, чем при трехкомпонентной иммуносупрессии, позволяло предположить снижение канальцевой реабсорбции кальция, но не раскрывало ни локализацию, ни механизм выявленного дефекта. Проведенный же предложенным методом анализ позволил установить, что нормальная величина

суммарной реабсорбции кальция у реципиентов АТП еще не означает нормального состояния процессов его канальцевой реабсорбции и достигается сочетанием снижения градиентного и усиления активного транспорта кальция. При ХОТ снижение суммарной реабсорбции кальция объясняется исключительно прогрессивным снижением реабсорбции натрия и градиентной реабсорбции кальция, несмотря на усиление активного транспорта кальция. Таким образом, разработанный нами метод позволяет дифференцировать состояние градиентной и активной реабсорбции кальция, открывает новые возможности анализа процессов реабсорбции кальция у человека вообще и у реципиента пересаженной почки, в частности, выявить и локализовать дефекты канальцевой реабсорбции кальция, определить тактику коррекции канальцевой реабсорбции.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Бородулин И.Э.* Реабсорбция кальция, магния и фосфора после аллотрансплантации трупной почки: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2008.
2. *Бородулин И.Э., Котенко О.Н., Бузулина В.П., Ермакова И.П.* Влияние иммуносупрессивной терапии на процесс транспорта кальция // Нефрология и диализ, 2001. Т. 3. С. 354–357.

3. *Бородулин И.Э., Котенко О.Н., Томила Н.А. и др.* Особенности проксимальной и дистальной реабсорбции кальция в условиях хронического отторжения аллотрансплантированной почки // Нефрология и диализ. 2001. Т. 3. № 4. С. 447–450.
4. *Бородулин И.Э., Котенко О.Н., Бузулина В.П.* Гомеостаз и канальцевая реабсорбция кальция, магния и фосфора в условиях хронического отторжения почечного трансплантата // Нефрология и диализ. 2006. Т. 8. № 3. С. 262–267.
5. *Бородулин И.Э., Котенко О.Н., Бузулина В.П. и др.* Гомеостаз и канальцевая реабсорбция кальция, магния и фосфора у реципиентов АТП с признаками нефротоксичности циклоспорина // Вестник трансплантолог. и искусств. органов. 2006. № 4. С. 27–31.
6. *Ермакова И.П., Томила Н.А., Бородулин И.Э. и др.* Сопряженный с натрием и активный транспорт кальция после аллотрансплантации почки (АТП) // Нефрология. 2001. Т. 5. № 3. 127 с.
7. *Наточин Ю.В.* Основы физиологии почки. Л.: Медицина, 1982.
8. *Christenson R.H.* Biochemical markers of bone metabolism: an overview // Clin Biochem. 1997. Vol. 30 (8). P. 573–593.
9. *Harinck M.I.J., Bijvoet O.L.M., Plantingh A.S.T. et al.* Role of bone and kidney in tumor-induced hypercalcemia and its treatment with bisphosphonates and sodium chloride // Amer. J. Med. 1987. Vol. 82 (6). P. 1133–1142.
10. *Nordin B.E.C.* Calcium, phosphate and magnesium metabolism. New York, 1976. P. 489.
11. *Seldin D.W.* Renal handling of calcium. Nephron. 1999. Vol. 81 (Suppl 1). P. 2–7.

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!**

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

**Подписной индекс** нашего издания в каталоге «Газеты и журналы» – 80248,



Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		80248 (индекс издания)								
			КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ								
на 2010 год по месяцам											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Куда											
		(почтовый индекс)		(адрес)							
Кому											
Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		80248 (индекс издания)								
			КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ								
на 2010 год по месяцам											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Куда											
		(почтовый индекс)		(адрес)							
Кому											