

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИСТАТИНА С В МОЧЕ БЕРЕМЕННЫХ

А. Н. Трифонова, О. В. Островский, В. Е. Веровский, А. А. Карева

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра клинической лабораторной диагностики, теоретической биохимии
с курсом клинической биохимии*

Рассчитаны аналитические характеристики иммутурбидиметрического метода определения концентрации цистатина С в моче: предел обнаружения, предел количественного определения. Установлены границы референтного интервала концентрации цистатина С в моче беременных, равные 0,17—0,25 мг/л.

Ключевые слова: цистатин С, беременность, преэклампсия, тубулярное повреждение почек.

ANALYTICAL AND CLINICAL ASPECTS OF MEASURING URINARY CYSTATIN C LEVELS IN PREGNANT WOMEN

A. N. Trifonova, O. V. Ostrovskiy, V. E. Verovskiy, A. A. Kareva

We assessed analytical characteristics of immunoturbidimetric determination of cystatin C levels in urine including the detection limit (LoD) and the limit of quantitation (LoQ). We have established the reference values for urinary cystatin C levels which are 0,17—0,25 mg/l.

Key words: cystatin C, pregnancy, preeclampsia, renal tubular injury.

Беременность, осложненная преэклампсией, приводит к увеличению как материнской, так и неонатальной заболеваемости и смертности. Клинические проявления болезни чрезвычайно многообразны, протекать она может неделями до того как будет установлен диагноз. Существующие методы ранней диагностики риска развития заболевания (на сроке 11—14 недель) далеки от совершенства [4], в то время как своевременно не распознанный риск вносит в материнскую смертность значительную долю из-за не соответствующего клиническому случаю лечения.

В настоящее время определение содержания цистатина С в сыворотке (или плазме) крови признано как ценный подтверждающий тест при хронических заболеваниях почек [1, 2, 5]. Повышение уровня этого белка в сыворотке крови отмечается также при беременности (с особенностями при преэклампсии во 2—3 триместрах [6]). Однако данные о возможности использования этого маркера для ранней диагностики преэклампсии достаточно неоднозначны [8].

В норме, цистатин С практически полностью разлагается в почках после фильтрации и в моче содержится лишь в незначительных количествах (~0,1 мг/л), так же как и при гломерулярной дисфункции, в то время как при тубулярной дисфункции его содержание в моче может повышаться до $(4,31 \pm 3,85)$ мг/л. Однако данные о клинической значимости этого показателя также весьма неоднозначны [7, 9].

При определении цистатина С могут быть использованы 2 иммунохимических метода: турбидиметрический (анализ проводится на обычных клинических биохимических анализаторах) и, более точный, нефелометрический (необходимо специальное оборудование) [10].

Это, наряду с высокой биологической вариабельностью показателя и асимметрией его распределения, вызывает также вопрос о значении диагностического порога при использовании того или иного способа определения цистатина С в моче.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Расчет аналитических характеристик иммутурбидиметрического метода определения концентрации цистатина С и исследование его содержание в моче беременных.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение концентрации цистатина С в моче иммутурбидиметрическим методом [10] проводили с использованием коммерческого набора фирмы «DiaSys» для сыворотки крови. Измерения проводили через 1 сутки после калибровки прибора «Sapphire 400» (Hirose Electronic Systems, Japan). Для определения предела обнаружения согласно ГОСТ-Р-ИСО-11843-2-2007 (ГО₂) использовали 6 разведений калибровочного раствора цистатина С («DiaSys») физиологическим раствором ($I = 6$, в диапазоне концентраций от 0,05 до 0,45 мг/л) в 5 приготовлениях ($J = 5$). При исследовании влияния матрицы калибровочный раствор разводили нативной или депротеинизированной мочой. Депротеинизированную мочу получали путем центрифугирования нативной мочи в пробирках «Vivaspin 15R 5000 MWCO» (Vivascience AG).

Для определения предела обнаружения согласно ГОСТ-Р-ИСО-11843-3-2007 (соответствует рекомендациям IFCC) в качестве «малых концентраций» использовали концентрации аналита 0,05 мг/л (ПО₂) и 0,1 мг/л (ПО₃). Все измерения проводились дважды (L и $K = 2$).

Определение содержания цистатина С проводили в утренней порции мочи беременных, полученных МУЗ «Женская консультация №1» г. Волгограда в течение 2 календарных недель при первом или плановом обращении. Характер течения беременности был прослежен в 60 случаях. Из них: 15 беременных I триместра (в последующем — преэклампсия у 3, без особенностей — 11); 24 беременных II триместра (в последующем — преэклампсия у 1, без особенностей — 21); 21 беременная III триместра (1 с диагнозом преэклампсия, без особенностей — 9). К анализу привлекались только результаты, полученные при первом обращении беременной в женскую консультацию в данном триместре.

Для определения параметров уравнения линейной регрессии и параметров распределения беременных по уровню цистатина С в моче (медиана, 2,5%, 25%, 75%, 97,5% квантили) использовали функции программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аналитические характеристики метода. Результаты исследования функции отклика метода приведены в табл. Поскольку коэффициент детерминации (R^2) превышал 0,97, то для расчета предела обнаружения вполне применим метод ГОСТ-Р-ИСО-11843-2-2007 ($ПО_1$). Результаты расчетов предела обнаружения по ГОСТ-Р-ИСО-11843-3-2007 ($ПО_2$ и $ПО_3$, табл.) для матриц, свободных от аналита, близки значениям $ПО_1$.

Вместе с тем, значения, полученные при использовании в качестве матрицы нативной мочи, значительно выше. То есть, корректный расчет предела обнаружения по ГОСТ-Р-ИСО-11843-3-2007 возможен только тогда, когда возможно получить матрицу, свободную от аналита. Полученные оценки предела обнаружения для турбидиметрического метода ($ПО_1$, табл.), в том числе для случая депротеинизированной мочи, были кратно больше значений, установленных для нефелометрического метода (0,008 мг/л). Далее, в качестве порога обнаружения, использовали максимальное значение $ПО_1$, полученное в условиях разведения калибратора нативной мочой (0,065 мг/л).

Анализ зависимости смещения измеренного значения показателя от приготовленного ($B\% = 100 \cdot (C_{\text{измеренная}} - C_{\text{приготовленная}}) / C_{\text{приготовленная}}$) и коэффициента вариации (КВ) от концентрации (рис. 1) показал, что при

концентрациях аналита 0,1 мг/л и выше В % не превосходит 5 %, а КВ % — 15 %. Судя по характеру зависимости (рис. 1), значения КВ % становятся меньше 10 %, начиная с концентраций аналита ~ 0,17 мг/л, вне зависимости от типа матрицы.

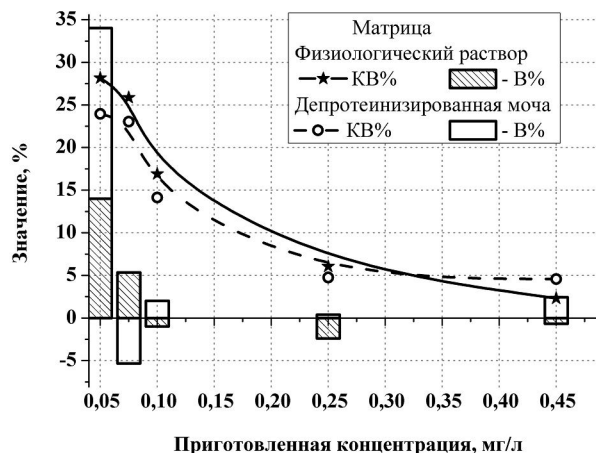


Рис. 1. Зависимость смещения и коэффициента вариации метода от концентрации цистатина С

Исследование содержания цистатина С в моче беременных. Результаты измерения концентрации цистатина С в утренней порции мочи беременных женщин приведены на рис. 2.

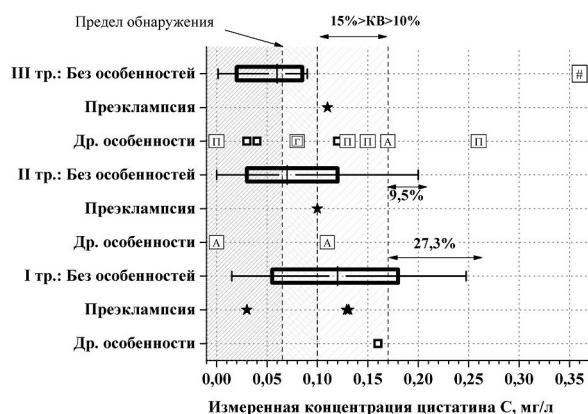


Рис. 2. Распределение беременных по уровню цистатина С в моче с учетом диагноза в амбулаторной карте и триместра беременности. Особенности отдельных клинических случаев: А — анемия; П — пиелонефрит; Г — гломерулонефрит; *беременная без особенностей в анамнезе с повышенным уровнем цистатина С

Параметры зависимости ($C_{\text{измеренная}} = a + b \cdot C_{\text{приготовленная}}$) и пределы обнаружения (мг/л) имунотурбидиметрического метода определения цистатина С в моче*

Матрица	a (M ± m)	b (M ± m)	ПО ₁	ПО ₂	ПО ₃
0,9% NaCl	0,005 ± 0,004	0,975 ± 0,016	0,036	0,043	0,044
Депротеинизированная моча	0,005 ± 0,004	1,00 ± 0,02	0,040	0,049	0,041
Нативная моча**	0,096 ± 0,007	0,979 ± 0,03	0,065	0,28	0,29

* $R^2 > 0,97$ для всех 3 матриц;

**измеренный уровень аналита в образце, использованном для разведения калибратора (M ± m), (0,14 ± 0,01) мг/л.

Отметим, что при использованном нами сочетании оборудования и реагентов в 36 случаях (60 %) результат измерения оказался ниже установленного предела обнаружения. Однако параметры распределения для женщин без особенностей в течение беременности оказались близки к параметрам контрольных групп, полученным в других исследованиях [3, 9].

В противовес характеру динамики цистатина С в плазме или сыворотке крови, где рост содержания этого белка повышается во 2 и 3 триместрах, более высокие значения показателя были получены для мочи беременных 1 триместра. Несколько повышенные (выше 0,25 мг/мл) уровни белка были обнаружены только в 2 случаях: 1 — у беременной с диагнозом «пиелонефрит» и 1 — у беременной 3 триместра без особенностей в диагнозе. В целом же, уровень белка у женщин с преэклампсией и гломерулярным пиелонефритом находился в пределах, характерных для женщин с нормальным течением беременности (рис. 2). Это наблюдение полностью согласуется с данными литературы [3], где преэклампсия даже в тяжелых случаях (интерквартильный размах альбумина составлял 151—1164 мкг/мг креатинина) сопровождалась лишь незначительным статистически не достоверным повышением цистатина С в моче.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы было установлено, что для беременных характерно увеличение содержания цистатина С в моче в 1 триместре. Получен референтный интервал цистатина С в моче для беременных, равный 0,17—0,25 мг/л. Следует отметить, что выдвинутая гипотеза о повышении уровня цистатина С в моче беременных с преэклампсией не оправдалась.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельков В. В. // Лабораторная диагностика. — 2010. — № 4. — С. 54.
2. Каюков И. Г., Смирнов А. В. и др. // Нефрология. — 2012. — Т. 16, № 1. — С. 22—39.
3. Burwick R. M., Easter S. R., Dawood H. Y., et al. // Hypertension. — 2014. — Vol. 64. — P. 833—838.
4. Duhig K. E., Shennan A. H. // F1000Prime Reports. — 2015. — Vol. 10. — P.7—24.
5. Inker L. A., Schmid C. H., Tighiouart H., et al. // N. Engl. J. Med. — 2012. — Vol. 367(1). — P.20—29.
6. Farag M. K., Ragab H. M., Khaled R., et al. // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. — 2011. — Vol. 9. — P.133—136.
7. Sang S. K., Sang H. S., In J. K., et al. // Diabetes Care. — 2013. — Vol. 36. — P. 656—661.
8. Kristensen K., Strevens H., Lindstrom V., et al. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 2008. — Vol. 68(7). — P.649—653.
9. Park M. Y., Choi S. J., Kim J. K., et al. // Nephrology. — 2013. — Vol. 18(4). — P.256—262.
10. Ristiniemi N., Savage C., Bruun L., et al. // Nephrol. Dial. Transplant. — 2012. — Vol.27. — P. 682—687.

Контактная информация

Трифенова Александра Николаевна — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: Aleksandra-ok@rambler.ru