

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 616.62-003.7-071

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИСТАЛЛООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ И УРЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МОЧИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МОЧЕВЫВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЕ

М.А. Горшкова¹, Г.П. Лапина², А.Н. Панкрушина²

¹Тверская государственная медицинская академия

²Тверской государственный университет

Разработан скрининговый метод одновременного определения кристаллообразующей способности и уреазной активности мочи. Определены аналитические характеристики, получены и рассчитаны референтные значения предлагаемой методики.

Ключевые слова: биохимическое исследование мочи, уреазная активность, кристаллообразующая способность.

Введение. Современная биохимическая лабораторная диагностика располагает большим количеством методик, которые применимы в диагностике мочекаменной болезни [1–3; 7; 10] и хронического пиелонефрита – наиболее значимых в медико-демографическом отношении. Данные нозологические единицы составляют основную долю (45%) уронефрологических заболеваний, их прогрессирование сопровождается значительным числом различных осложнений и требует серьезного специализированного лечения у специалистов-урологов. Болезни органов мочеполовой системы занимают в структуре первичной инвалидности до 4%. Таким образом, урологические заболевания являются одной из причин снижения качества жизни, инвалидизации и преждевременной смертности, создают целый ряд проблем социального и экономического характера.

Особый интерес представляют методы лабораторных исследований, которые могли бы быть использованы в урологической практике клинко-диагностических лабораторий лечебных учреждений амбулаторно-поликлинического звена до нозологических стадий заболевания.

В связи с этим, целью данной работы явилась разработка скринингового метода выявления изменений в составе мочи для диагностики урологических заболеваний в клинко-диагностических лабораториях первичного звена [4–6].

Материал и методика. Работа выполнена на кафедре физико-химической экспертизы биоорганических соединений ФГБОУ ВПО

«Тверской государственной университет» и на базе клинко-диагностической лаборатории Клиники ГБОУ ВПО «Тверская ГМА МЗ РФ». Исследования проводились в рамках научного направления ТГМА «Инновационные технологии для ранней диагностики неинвазивными методами социально-значимых заболеваний».

Материалом исследования служила моча пациентов с амбулаторного приема. Было проанализировано 264 пробы биологического материала от пациентов мужского и женского пола в возрасте от 21 до 75 лет. В качестве базового метода была принята качественная методика – тест на кальцифилаксию, рекомендованный в качестве скрининг-тестов МосОМКЗ НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РСФСР в 1982 г. [8]. Принцип метода основан на том, что при добавлении к 1,0 мл мочи 0,1 мл 10% водного раствора CaCl_2 образуется нерастворимый осадок солей кальция при взаимодействии с солями, присутствующими в моче. В качестве второй базовой методики была взята методика определения уреазной активности мочи, разработанной в 1995 г. на базе клинко-биохимической лаборатории Научного Центра Урологии им. Б.У. Джарбусынова [9].

Модификация метода состояла в том, что нами было предложено одновременное выполнение реакций в 96-луночном микропланшете, используемом в иммуноферментных исследованиях.

Статистический анализ полученных результатов осуществлялся с помощью компьютерной программы SPSS 12.0 (SPSS Inc., США). Для определения достоверности различий средних значений в исследуемых группах применялся двухсторонний t-критерий Стьюдента, как для зависимых, так и для независимых выборок. В случаях, когда данные имели отклонения от нормального распределения, использовались непараметрические статистические критерии, в частности U-критерий Манна-Уитни. Также использовался пакет программ Excel версия 7.0, раздел программ «Анализ данных». Различия между сравниваемыми величинами признавались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. На первом этапе эксперимента адаптировали методику количественного определения кристаллообразующей способности и уреазной активности мочи для проведения скрининговых исследований. Данная задача по модификации метода возникла в связи с тем, что скрининговые обследования проводятся на больших группах населения и использовать для скрининга пробирочные методы трудоемки и экономически неоправданны. В настоящее время скрининговый метод анализа мочи – один (тест-полоски), и других адекватных методик в лечебных учреждениях первичного звена не предложено. Схема выполнения

реакции на кристаллообразующую способность и урезную активность мочи в 96-луночном микропланшете представлена в табл. 1.

Таблица 1

Схема постановки реакции в 96-луночном планшете

№ лунок	Контрольные пробы	№ лунок	Опытные пробы
A1	контроль бланка 0,275 мл H ₂ O	A2	бланк 0,250 мл H ₂ O + 0,025 мл 10% CaCl ₂
B1	стандарт 0,250 мл оксалата натрия + 0,025 мл H ₂ O	B2	стандарт 0,250 мл оксалата натрия + 0,025 мл 10% CaCl ₂
C1	0,250 мл мочи №1 + 0,025 мл H ₂ O	C2	0,250 мл мочи №1 + 0,025 мл 10% CaCl ₂

Таким образом, на одном микропланшете можно исследовать до 46 проб мочи разных пациентов. Микропланшет осторожно перемешивался и измерялась оптическая плотность на микропланшетном ридере при длине волны 620 нм. Затем микропланшет заклеивался пленкой и ставился в термостат на 1 час при температуре 37° С. После термостатирования снова перемешивался и измерялась оптическая плотность на микропланшетном ридере при длине волны 620 нм.

На следующем этапе работы с использованием адаптированного нами метода было проведено определение аналитических характеристик методики. Аналитические характеристики предлагаемой методики:

1). Воспроизводимость метода определяется с помощью коэффициента вариации (CV). Для нахождения воспроизводимости брали 10 повторных проб одного образца, выполняли опыты по вышеуказанной методике и высчитывали среднее значение, затем рассчитывали коэффициент вариации по формуле:

$$CV = S / X * 100\%,$$

где CV – коэффициент вариации, S – величина среднеквадратичного отклонения, X – среднее арифметическое значение всех 10 опытов.

$$CV = (0,0292 / 1,8248) * 100 = 1,6\%$$

Коэффициент вариации составил 1,6 %.

2). Точность разработанного метода определяли по отклонению от стандартной величины. Для этого брали стандартный раствор оксалата натрия с известным значением концентрации и вычисляли погрешность отклонения от стандартной величины 1,34 г/дл.

$$\text{Ошибка} = (1,34 - 1,31) / 1,31 * 100 \% = 2,29\%.$$

Стандартная ошибка при проведении исследования составила 2,29%, точность метода – 97,52 % .

3) Чувствительность – это наименьшая концентрация определяемого параметра, которая составила 0,046 мг/дл.

4). Специфичность предлагаемого метода

Для определения специфичности метода необходимо определить, какие вещества, содержащиеся в моче (в норме и патологии) могут оказать влияние на количественное определение, то есть какие вещества будут взаимодействовать с 10% раствором хлорида кальция. Так как определяется общая суммарная способность мочи на взаимодействие с хлоридом кальция (то есть на все соли, которые могут вступить в реакцию), то этот параметр в определении аналитической характеристики не важен.

Для определения уреазной активности использовался раствор уреазы (с активностью 1000 Е/дл) из коммерческого набора реагентов для определения мочевины в биологических жидкостях уреазным фенол/гипохлоритным методом (Мочевина-02-ВИТАЛ, LOT серия 0349, REF B08.02). Формула расчета уреазной активности в Е/дл представляет собой произведение ΔD (изменение оптической плотности до термостатирования и после термостатирования) на коэффициент 1165,954 уреазной активности.

Следующей задачей нашей работы стало определение референтных значений предлагаемой методики. В опыте использовали все доставленные в лабораторию пробы мочи. Определение нормальных (референтных величин) определялось в группе пациентов с амбулаторного приема (случайный выбор). Таким образом, если распределение признака отвечает закону Гаусса, то нормальные лабораторные показатели определяют как среднее значение показателя для здоровой популяции +2 стандартных отклонения (+2SD). После проведения статистической обработки данных изменение оптической плотности ΔD (Cut-off) для кристаллообразующей способности мочи соответствовал 0,23. Cut-off соответствовала 7,31 единиц S-H или 17,62 мг/дл. Таким образом, пробы мочи пациентов, давшие изменение оптической плотности $\Delta D < 0,230$ (или соответственно меньше 7,31 единиц S-H или 17,62 мг/дл) были определены в группу «Норма», а пробы мочи пациентов с значениями $\Delta D > 0,230$ (или соответственно больше 7,31 единиц S-H или 17,62 мг/дл) попали в группу «Патология».

После проведения статистической обработки данных изменение оптической плотности ΔD (Cut-off) для уреазной активности мочи соответствовал 0,166. Cut-off соответствовала 12,623 мг/дл или 193,548 Е/дл. Таким образом, пробы мочи пациентов, давшие изменение оптической плотности $\Delta D < 0,166$ (или соответственно меньше 12,623 мг/дл или 193,548 Е/дл) были определены в группу «Норма», а пробы мочи пациентов с значениями $\Delta D > 0,166$ (или соответственно больше

12,623 мг/дл или 193,548 Е/дл) попали в группу «Патология». Полученные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Уровень кристаллообразующей способности мочи у мужчин и женщин с амбулаторного приема (n=206)

Показатель	Группа «Норма»		Группа «Патология»	
	мужчины (n=60)	женщины (n=78)	мужчины (n=20)	женщины (n=30)
Кристаллообразующая способность мочи (ΔD)	0,056 $\pm 0,009$	0,042 $\pm 0,006$	0,458 $\pm 0,041^*$	0,550 $\pm 0,044^*$
Кристаллообразующая способность мочи (ед S-H)	1,773 $\pm 0,312$	1,329 $\pm 0,198$	14,616 $\pm 1,307^*$	17,567 $\pm 1,418^*$
Кристаллообразующая способность мочи (мг/дл)	4,242 $\pm 0,746$	3,18 $\pm 0,527$	34,976 $\pm 3,126^*$	42,042 $\pm 3,394^*$

Примечание. Достоверность различий * $p < 0,01$ – между двумя группами.

По результатам исследования общее количество пациентов мужского пола, попавших в группу с отрицательными результатами составило 61 человек (74,39%), с положительными – 21 человек (25,61%). Общее количество пациентов женского пола, попавших в группу с отрицательными результатами составило 99 человек (77,95%), с положительными – 28 человек (22,05%). Из обследованных по профилактическому осмотру населения 23,44% людей имели изменения в составе мочи, дающие активный процесс камнеобразования.

Активность уреазообразующей микрофлоры в моче способствует образованию кристаллов. Микробы в процессе своей жизнедеятельности выделяют в мочу фермент уреазу (К.Ф. 3,5.1.5) – карбамидамидогидролазу, которая представляет собой белок и имеет различную степень активности в зависимости от вида микроорганизма. Под действием фермента уреазы повышается рН мочи, уровень аммония, что создает благоприятные условия для кристаллизации, образуя при этом многочисленные ядра камней. Уреазная активность мочи определяется после термостатирования в течение 1 часа при температуре 37° С. Формула расчета уреазной активности представляет собой произведение ΔD (изменение оптической плотности до термостатирования и после термостатирования) на коэффициент 76,0435 (коэффициент перевода в мг/дл) или на коэффициент 1165,954 уреазной активности в Е/дл. Результаты исследования на уреазную активность мочи с амбулаторного приема представлены в табл. № 3.

Таблица 3

Уровень уреазной активности мочи у мужчин и женщин с амбулаторного приема (n=206)

Показатель	Группа «Норма»		Группа «Патология»	
	мужчины (n=52)	женщины (n=84)	мужчины (n=28)	женщины (n=42)
Уреазная активность мочи (ΔD)	0,034 $\pm 0,003$	0,038 $\pm 0,002$	0,3207 $\pm 0,015^*$	0,3598 $\pm 0,013^*$
Уреазная активность (мг/дл)	5,893 $\pm 1,066$	5,809 $\pm 0,289$	46,456 $\pm 3,035^*$	48,203 $\pm 2,538^*$
Уреазная активность (Е/л)	39,418 $\pm 1,192$	44,345 $\pm 0,808$	373,921 $\pm 13,558^*$	419,517 $\pm 12,705^*$

Примечание. Достоверность различий * $p < 0,01$ – между двумя группами.

По результат исследования общее количество пациентов мужского пола, попавших в группу с отрицательными результатами составило 52 человека (63,41%), с положительными – 30 человек (36,59%). Общее количество пациентов женского пола, попавших в группу с отрицательными результатами составило 91 человек (71,65%), с положительными – 36 человек (28,35%). Из обследованных по профилактическому осмотру населения 31,58% людей имели процесс бактериального инфицирования мочевыводящих путей, с уреазной активностью более 12,6 мг/дл или 193,5 Е/дл, что соответствует данным клинико-биохимической лаборатории Научного Центра Урологии им. Б.У. Джарбусынова [9].

Заключение. Показатели кристаллообразующей способности и уреазной активности мочи являются перспективными в прогнозировании процесса камнеобразования и отражают наличие активной уреазообразующей микрофлоры в моче, которая способствует образованию кристаллов. Общий анализ мочи (сложная медицинская услуга, состоящая из 9 простых медицинских услуг) является обязательным и включен в стандарт обследования пациентов общетерапевтической направленности, а также при профилактических осмотрах сотрудников учреждений. Определение кристаллообразующей и уреазной способности мочи может быть включено в перечень простых медицинских услуг в составе сложной медицинской услуги «Общего анализа мочи» для раннего выявления и динамического наблюдения за изменениями в составе мочи.

Список литературы

1. *Акопян А.В.* Маркеры повышенного риска камнеобразования у детей и эффективность дифференцированной профилактики: автореф. дис.

- ... канд. мед. наук / НИИ педиатрии ГУ НЦ здоровья детей РАМН – М., 2007. 18 с.
2. Алчинбаев М. К., Малик А. М., Меркушева Н. В., Маконина И. А. Лабораторные методы прогнозирования первичного и рецидивного камнеобразования в почках // Урология. 2000. № 5. С. 9–10.
 3. Аляев, Ю.Г., Руденко В.И., Газимиев М.-С.А. Мочекаменная болезнь. Актуальные вопросы диагностики и выбора метода. М.;Тверь: Триада, 2006. 236 с.
 4. Горшкова М.А., Панкрушина А.Н., Котельникова О.А. Экспресс-метод количественного определения суммарной кристаллообразующей активности мочи к солям кальция с целью диагностики мочекаменной болезни // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер. Биология и экология. 2009. Вып. 15, № 34, 2009. С.99–104.
 5. Горшкова М.А., Панкрушина А.Н. Использование модифицированного экспресс-метода определения кристаллообразующей способности мочи в скрининговых профилактических осмотрах // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. № 9. С. 57.
 6. Горшкова М.А. Клинико-экономический анализ эффективности скринингового лабораторного обследования с целью выявления пациентов с мочекаменной болезнью по двухэтапному исследованию мочи// Клиническая лабораторная диагностика. 2011. № 10.С. 14.
 7. Инструкция по применению комплекта диагностических тест-карт и белкового реактива для диагностики мочекаменной болезни «ЛИТОС-система». М.: МОНИКИ, 1997. 22 с.
 8. Скрининг-тесты для диагностики метаболических нарушений при уронефрологических заболеваниях у детей: метод. рекомендации. М., 1982. 25 с.
 9. Меркушева Н.В., Юшина Л.В., Махонина И.А. Уреазная активность мочи у больных мочекаменной болезнью // Урология и нефрология. 1997. С. 13–14.
 10. Эммануэль В.Л. Лабораторная диагностика заболеваний почек. 2-е изд., испр. и доп. СПб.; Тверь: Триада, 2006. 78 с.

**SIMULTANEOUS DEFINITION CHRYSTAL-COMPOSING
ACTIVITY AND UREASE ACTIVITY OF URINE
FOR IDENTIFICATION OF PATHOLOGICAL PROCESSES
IN THE URINE SYSTEM**

M.A. Gorshkova¹, G.P. Lapina², A.N. Pankrushina²

¹Tver State Medical Academy

²Tver State University

The skringing method of simultaneous determination of chrystal-composing activity ability and urease activity of urine is developed. Analytical characteristics are defined, referential values of an offered technique are received and calculated.

Keywords: *biochemical research of urine, urease activity, chrystal-composing activity.*

Об авторах:

ГОРШКОВА Марина Анатольевна—врач высшей категории, заведующая клинико-диагностической лаборатории поликлиники, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: marigor@tvcom.ru

ЛАПИНА Галина Петровна—доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой физико-химической экспертизы биоорганических соединений, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: Galina.Lapina@tversu.ru

ПАНКРУШИНА Алла Николаевна—доктор биологических наук, профессор кафедры биомедицины, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: alla.pankrushina@mail.ru