

УДК: 616-71: 616.61

Мониторинг потерь белка с перитонеальным диализатом у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности

Г. А. Коноплев¹, А.И. Кузнецов², В. Корсаков³, О.С. Степанова¹, Н.В. Рощина¹, Н.А. Овсянников¹, Д.О. Лялин¹, Н.С. Лыфарь¹, Р.П. Герасимчук⁴, З.М. Рустамова⁵, А.Н. Исачкина⁵, А. Фро-рип²

¹ СПбГЭТУ «ЛЭТИ» (Санкт-Петербург, Россия)

² Ldiamon AS (Тарту, Эстония)

³ Jeko Disain OÜ (Тарту, Эстония)

⁴ Городская Мариинская больница (Санкт-Петербург, Россия)

⁵ СЗГМУ им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург, Россия)

Адрес для корреспонденции: gakonoplev@etu.ru

Аннотация

Постановка проблемы. Хроническая болезнь почек (ХБП) выступает одной из основных причин смертности и инвалидизации среди неинфекционных заболеваний в развитых странах. В ряде случаев данное заболевание прогрессирует до терминальной стадии хронической почечной недостаточности (тХПН), что требует проведения заместительной почечной терапии (ЗПТ) в течение всей жизни больного. Одним из наиболее распространенных методов ЗПТ является постоянный амбулаторный перитонеальный диализ (ПАПД), который всегда сопровождается нежелательной потерей белка с диализатом. Потенциально повысить эффективность и безопасность процедуры возможно путем проведения регулярного контроля уровня общего белка в отработанном перитонеальном диализате.

Цель. Создание автоматизированной системы мониторинга потери белка с перитонеальным диализатом у больных тХПН, получающих лечение ПАПД, предназначенной для работы во внелабораторных условиях в рамках концепции «прикроватной диагностики» или *point-of-care testing* (РОСТ).

Результаты. Разработан доступный по стоимости, конструктивно несложный и удобный в использовании оптико-электронный химический сенсор на основе быстрой жидкостной хроматографии белков с УФ фотометрическим детектированием на длине волны 285 нм для экспресс-оценки уровня общего белка в перитонеальном диализате. Сенсор предполагает многократное использование; аналитическая процедура занимает не более 10–15 минут и потенциально может выполняться самими пациентами или младшим медицинским персоналом без лабораторной подготовки. Создано программное обеспечение для калибровки сенсора, автоматизированного измерения хроматограмм, идентификации и аппроксимации пиков, оценки концентрации белка по хроматограмме. Предварительные клинические испытания выявили хорошее соответствие между данными, полученными с помощью сенсора, и результатами биохимического анализа: средняя относительная погрешность составила около 10%, что сопоставимо с погрешностью рутинных клинико-лабораторных методов.

Практическая значимость. Разработанная система может быть использована в практическом здравоохранении для мониторинга состояния больных тХПН, получающих лечение ПАПД.

Ключевые слова

Оптический химический сенсор; быстрая жидкостная хроматография белков; УФ светодиод; перитонеальный диализ; хроническая болезнь почек; терминальная стадия хронической почечной недостаточности; перитонеальная потеря белка; прикроватная диагностика.

Введение

Хроническая болезнь почек (ХБП) является одной из ведущих причин смертности и инвалидизации среди неинфекционных заболеваний, в развитых странах ей страдает около 10% населения [1]. В ряде случаев данное заболевание прогрессирует до терминальной стадии хронической почечной недостаточности (тХПН), которая сопровождается практически полной утратой почечной функции и требует проведения заместительной почечной терапии (ЗПТ) в течение всей жизни больного. В качестве ЗПТ в основном используют трансплантацию почки, хронический гемодиализ (ГД), гемодиализацию (ГДФ), автоматизированный

перитонеальный диализ (АПД) и постоянный амбулаторный перитонеальный диализ (ПАПД) [2]. Особенностью ПАПД является возможность проведения процедуры в домашних условиях без привлечения квалифицированного медицинского персонала или использования специального оборудования, что в ряде случаев (жители удаленных населенных пунктов, маломобильные пациенты, дети, пациенты с некоторыми сопутствующими заболеваниями, личные предпочтения) дает ПАПД значительные преимущества перед более распространенным ГД [3,4]. В ходе проведения ПАПД свежий стерильный диализат из специализированного пластикового пакета вручную (под действием силы тяжести) вводится в брюшную полость через постоянный перитонеальный катетер и удерживается там в течение нескольких часов, при этом низко- и средномолекулярные продукты метаболизма и избыточная жидкость за счет эффектов диффузии и конвекции мигрируют из мелких капилляров брюшины в диализат, который впоследствии сливается в тот же самый пакет и заменяется свежим. Данный процесс, называемый перитонеальным обменом, обычно повторяется 4–6 раз в сутки [5,6].

Аномально высокая потеря белков с перитонеальным диализатом является одним из наиболее серьезных побочных эффектов данной терапии [7-9] и выступает возможным предиктором диализного перитонита – тяжелого и часто опасного для жизни осложнения ПАПД [10]. Тем не менее, в соответствии с действующими протоколами проведения ПАПД потеря белка обычно оценивается один раз в три месяца во время плановых посещений диализного центра [6]. В данном контексте регулярное определение общего белка в отработанном диализате и оценка суточной потери белка в домашних условиях с помощью устройств, построенных по принципу «прикроватной диагностики» или *point-of-care testing* (РОСТ) [11], потенциально могут повысить безопасность и эффективность лечения. Существующие внелабораторные методы определения белка либо слишком дорогостоящи для многолетнего повседневного использования (одноразовые тестовые системы), либо ненадежны (методы «сухой химии»). Кроме того, такие инструменты часто калибруются для определения белка в моче и могут давать неточные результаты для перитонеального диализата [12].

Ранее фирмой Ldiamon AS (Тарту, Эстония) был разработан оптико-электронный химический сенсор на основе быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) с фотометрическим детектированием с помощью УФ светодиода на длине волны 285 нм, который успешно применялся для диагностики протеинурии [13] и контроля качества мясных и рыбных продуктов [14]. Прибор предназначен для многократного использования и обеспечивает прямое безреагентное хроматографическое определение общего белка и низкомолекулярных метаболитов в биологических жидкостях. Недавние исследования показали, что устройство может быть адаптировано для оценки перитонеальной потери белка [15]. Одним из препятствий для дальнейшего внедрения разработанного прибора и методики определения белка с помощью FPLC в клиническую практику в качестве РОСТ системы выступает недостаточная автоматизация процессов регистрации, предварительной обработки и анализа хроматограмм.

Целью данной работы является создание автоматизированной системы мониторинга потери белка с перитонеальным диализатом у больных тХПН, получающих лечение ПАПД, предназначенной для работы во внелабораторных условиях в рамках концепции РОСТ, в частности разработка усовершенствованных математических алгоритмов и специализированного программного обеспечения, реализующих анализ и обработку данных, которые могли бы обеспечить большую надежность и более высокую степень автоматизации оптико-электронного химического сенсора на основе FPLC.

Материалы и методы

Быстрая жидкостная хроматография белков. В качестве основного хроматографического метода для разделения белков была использована гель-фильтрация на недорогих мини-колонках *PD-10*, содержащей смолу *Sephadex G-25* (предел исключения $M=5000$ Да) [16]. Молекулы белка по размерам превосходят поры в гелевой матрице и быстро элюируются свободным объемом буфера, в то время как молекулы меньшего размера проникают в поры и элюируются несколько позже [17].

Оптико-электронный химический сенсор. Разработанное устройство состоит из хроматографической колонки PD-10, кварцевой проточной кюветы, фотометрического модуля на основе УФ светодиода и солнечно-слепого фотоприемника и электронного модуля на базе микроконтроллера с внешним интерфейсом USB 2.0 (рис. 1, а). Светодиод излучает оптическое излучение с длиной волны 285 нм, которая была выбрана в соответствии с характеристической полосой поглощения альбумина (рис. 1, а, врезка).

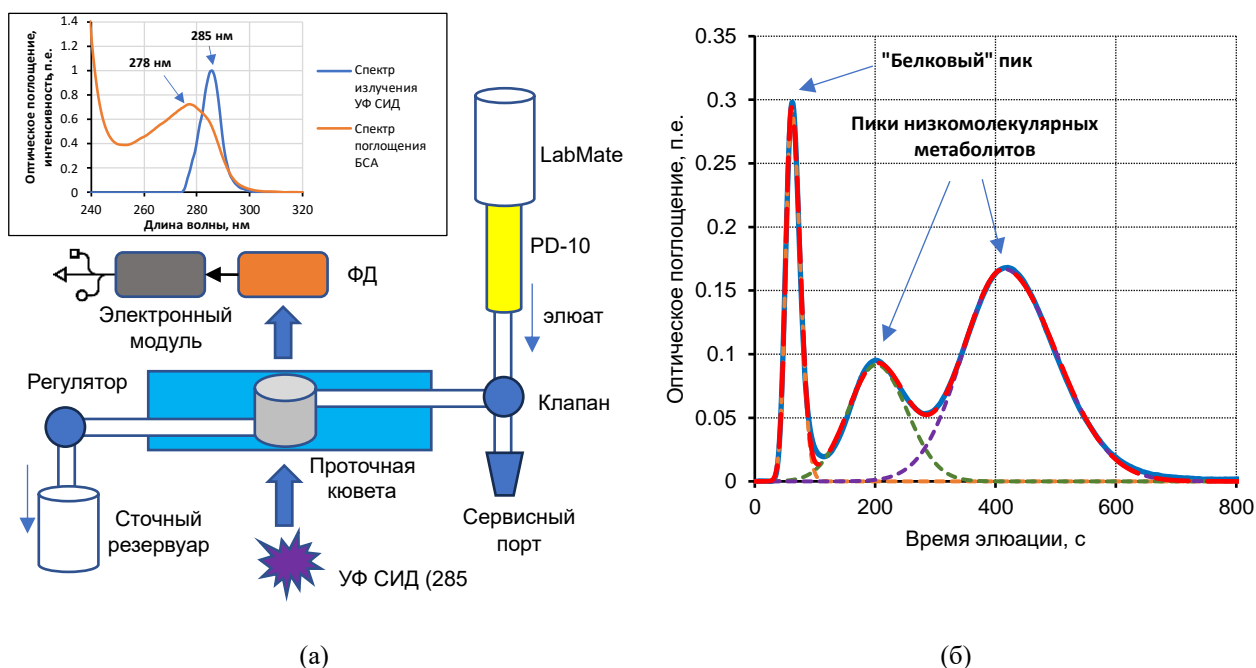


Рис. 1. (а) Структурная схема сенсора; спектр поглощения бычьего сывороточного альбумина (БСА) и спектр излучения УФ СИД (врезка); (б) пример хроматограммы перитонеального диализата, аппроксимированной набором разделенных гауссовых функций.

Гидравлическая система сенсора управляется вручную и включает в себя буферный резервуар *LabMate*, универсальный трехходовой клапан, сервисный порт для очистки системы и удаления из нее воздушных пузырьков, механический регулятор скорости протекания жидкости и сточный резервуар. Более детальное описание сенсора приведено в работах [14] и [15].

Пробоподготовка. Остаточные пробы перитонеального диализата были предоставлены Санкт-Петербургской городской Мариинской больницей и Северо-Западным государственным медицинским университетом им. И.И. Мечников. Пробоподготовка осуществлялась методом

микрофльтрации на шприцевом фильтре из гидрофильного стекловолокна GF/V диаметром 24 мм и размером пор 1,0 мкм во избежание контаминации колонки биологическими клетками и другими крупными частицами.

Регистрация хроматограмм. Перед регистрацией каждой хроматограммы колонку регенерировали 25 мл ТРИС-буфера (рН 8,0). Непосредственно после регенерации 500 мкл перитонеального диализата с помощью дозатора наносили непосредственно на поверхность геля. Ранее было показано, что указанный объем пробы обеспечивает наименьшие инструментальные погрешности устройства [18]. Через 1–2 минуты, когда проба полностью впитывалась гелем, трехходовой клапан закрывали и в резервуар LabMate наливали 25 мл буфера. Затем в управляющей программе активировали режим регистрации хроматограммы и одновременно открывали клапан; процедура измерения занимала от 10 до 15 минут. В конце каждого рабочего дня колонку промывали 10 мМ раствором NaOH в рабочем буфере.

Калибровка. Калибровку проводили перед каждой серией измерений. На первом этапе скорость потока жидкости в системе регулировали вручную для достижения временного интервала между хроматографическими пиками БСА и гипоксантина в модельных калибровочных растворах порядка 280 ± 5 с. На следующем этапе сенсор калибровали набором стандартных растворов БСА с концентрациями в диапазоне 0,5–10 г/л, выбранными близкими к физиологическим концентрациям белка в отработанном перитонеальном диализате [9,15,18].

Алгоритмы обработки данных

В ходе измерения хроматограмм фотометрический модуль устройства непрерывно регистрирует световой I_{ON} (светодиод включен) и темновой I_{OFF} (светодиод выключен) выходные сигналы фотоприемника, а микроконтроллер в электронном модуле преобразует их в цифровую форму в дискретный момент времени t , выполняет базовую фильтрацию, вычитает темновой сигнал из светового и записывает рабочий сигнал $I(t) = I_{ON}(t) - I_{OFF}(t)$ во внутреннюю память с временным разрешением 1 сек. Ток в цепи питания светодиода устанавливается в начале измерения, когда через кювету протекает чистый буфер, таким образом, чтобы опорный сигнал

I_0 (базовая линия) заполнял полную шкалу АЦП. Вся последующая обработка сигналов осуществляется внешним ПО.

Рабочий сигнал $I(t)$ преобразуются в оптическое поглощение $A_{285}(t)$ на длине волны 285 нм в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$A_{285}(t) = \log \left(\frac{I_0}{I(t)} \right). \quad (1)$$

Типичная FPLC хроматограмма отработанного перитонеального диализата представлена на рис. 1, б. На ней хорошо видны три сильно перекрывающихся пика: первый пик надежно ассоциируется с белками в пробе; два других, вероятно, соответствуют метаболитам средней и низкой молекулярной массы. Все три пика на хроматограммах асимметричны, и экспериментальная кривая может быть аппроксимирована суммой разделенных функций Гаусса (рис. 1, б) с использованием численного алгоритма Левенберга-Марквардта:

$$A_{285}(t) = \sum_{n=1}^N g(t, t_n, \sigma_n^L, \sigma_n^R),$$

$$g(t, t_n, \sigma_n^L, \sigma_n^R) = \begin{cases} G_n \exp \left(-\frac{(t-t_n)^2}{2(\sigma_n^L)^2} \right), & t \leq t_n \\ G_n \exp \left(-\frac{(t-t_n)^2}{2(\sigma_n^R)^2} \right), & t > t_n \end{cases} \quad (2)$$

где G_n – амплитуда n -го пика, t_n – время элюирования n -го пика, σ_n^L и σ_n^R – полуширина левой и правой части n -го пика, N – число пиков.

В работах [15] и [18] было показано, что площадь правой части первого пика S_1 пропорциональна концентрации белка в пробе:

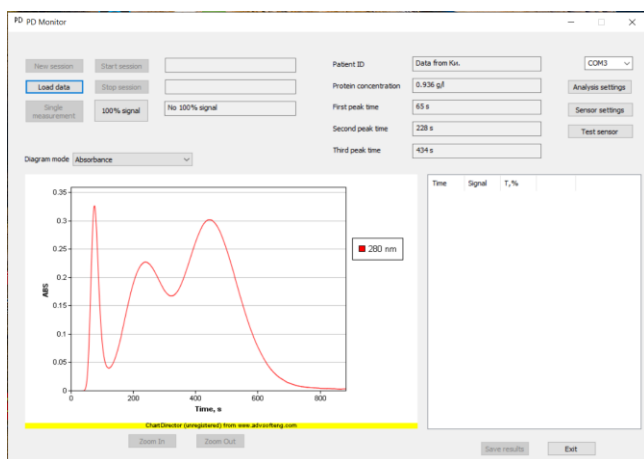
$$C_{\text{TP}} = B_1 + B_2 \cdot S_1, \quad S_1 = G_1 \int_{t_1}^{\infty} \exp \left(-\frac{(t-t_1)^2}{2(\sigma_1^R)^2} \right) dt. \quad (3)$$

Коэффициенты линейной регрессии B_1 и B_2 могут быть найдены путем калибровки по набору модельных растворов БСА или, с большей точностью, по набору проб перитонеального диализата, где общий белок параллельно определяется стандартным лабораторным методом.

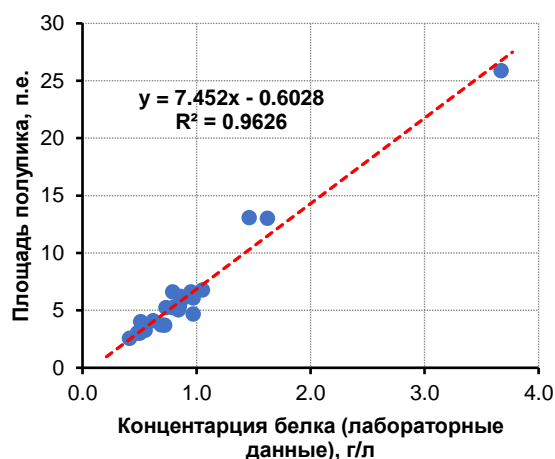
Описанные выше алгоритмы обработки данных были реализованы в специализированном ПО PD Monitor 1.0, написанном в среде разработки Microsoft Visual C++.

Программное обеспечение

PD Monitor 1.0 обеспечивает функционал для управления работой сенсора, автоматизированной регистрации данных фотометрического детектирования, предварительной обработки и анализа хроматограмм, идентификации и аппроксимации хроматографических пиков, калибровки сенсора, определения концентрации белка в пробе и оценки суточной потери белка с перитонеальным диализатом. Алгоритм измерений начинается с калибровки (выполняется не реже одного раза в неделю), ввода параметров работы устройства (рабочий ток и тайминги светодиода, временное разрешение и т. д.), исходных данных для расчета концентрации белка и информации о больном, у которого взята проба. На следующем шаге в главном окне программы (рис. 2, а) активируется режим регистрации хроматограммы.



(а)



(б)

Рис. 2. (а) Главное окно программы, (б) зависимость площади правой половины белкового полука в хроматограммах серии проб перитонеального диализата от концентрации белка, определенной лабораторными методами

Концентрация общего белка в пробе вычисляется автоматически после завершения регистрации хроматограммы и отображается в главном окне. Хроматограмма в форме таблицы, исходные данные для расчета концентрации, данные пациента и результаты анализа автоматически сохраняются в файле отчета (в виде текстового файл формата csv).

Заключение

Для проверки разработанных устройства и методики, а также тестирования программного обеспечения остаточные пробы перитонеального диализата, полученные от группы из 28 больных с тХПН, были параллельно проанализированы с помощью сенсора и в биохимической лаборатории больницы с помощью автоматического анализатора стандартным методом. Коэффициент корреляции между площадью правой половины первого «белкового» пика S_1 и концентрацией общего белка C_{TP} составил $R^2=0.96$ (рис. 2, б), средняя ошибка определения общего белка с помощью сенсора не превышала 10%, что сопоставимо с погрешностью рутинных лабораторных методов в клинической биохимии. Таким образом, было доказано, что оптоэлектронный сенсор на основе FPLC, разработанные алгоритмы обработки данных и программное обеспечение PD Monitor 1.0 являются работающими инструментами для мониторинга потери перитонеального белка у пациентов с ПАПД, которые потенциально могут быть внедрены в клиническую практику в качестве РОСТ диагностических систем.

Благодарности

Авторы выражают благодарность врачам и медсестрам Санкт-Петербургской городской Мариинской больницы и Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова за помощь в получении проб перитонеального диализата.

Исследование проводилось в рамках проекта № FSEE-2020-0008.

Список источников

1. Bikbov B. et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // *Lancet* (London, England). 2020. 395. № 10225. С. 709–733. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30045-3.
2. Drukker, Parsons, Maher, Hörl W. H., Koch K. M., Lindsay R. M., Ronco C., Winchester J. F. *Replacement of Renal Function by Dialysis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. doi: 10.1007/978-1-4020-2275-3.
3. Li P. K.-T. et al. Changes in the worldwide epidemiology of peritoneal dialysis // *Nature reviews. Nephrology*. 2017. 13. № 2. С. 90–103. doi: 10.1038/nrneph.2016.181
4. Mehrotra R., Devuyst O., Davies S. J., Johnson D. W. The Current State of Peritoneal Dialysis // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2016. 27. № 11. С. 3238–3252. doi: 10.1681/ASN.2016010112
5. Nissenson A. R., Fine R. N. *Handbook of dialysis therapy*. 5-е изд. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-323-39154-2
6. Teitelbaum I. et al. KDOQI US Commentary on the 2020 ISPD Practice Recommendations for Prescribing High-Quality Goal-Directed Peritoneal Dialysis // *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2021. 77. № 2. С. 157–171. doi: 10.1053/j.ajkd.2020.09.010.
7. Chang T. I., Kang E. W., Lee Y. K., Shin S. K. Higher peritoneal protein clearance as a risk factor for cardiovascular disease in peritoneal dialysis patients // *PloS one*. 2013. 8. № 2. e56223. doi: 10.1371/journal.pone.0056223.
8. Guedes A. M. Peritoneal Protein Loss, Leakage or Clearance in Peritoneal Dialysis, Where Do We Stand? // *Peritoneal dialysis international: journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. 2019. 39. № 3. С. 201–209. doi: 10.3747/pdi.2018.00138.
9. Lu W. et. Al Peritoneal protein clearance predicts mortality in peritoneal dialysis patients // *Clinical and experimental nephrology*. 2019. 23. № 4. С. 551–560. doi: 10.1007/s10157-018-1677-9.

10. Dong J., Chen Y., Luo S., Xu R., Xu Y. Peritoneal protein leakage, systemic inflammation, and peritonitis risk in patients on peritoneal dialysis // *Peritoneal dialysis international: journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. 2013. 33. № 3. C. 273–279. doi: 10.3747/pdi.2011.00326.
11. Lingervelder D., Koffijberg H., Kusters R., IJzerman M. J. Point-of-care testing in primary care: A systematic review on implementation aspects addressed in test evaluations // *International journal of clinical practice*. 2019. 73. № 10. e13392. doi: 10.1111/ijcp.13392.
12. Dube J., Girouard J., Leclerc P., Douville P. Problems with the estimation of urine protein by automated assays // *Clinical biochemistry*. 2005. 38. № 5. C. 479–485. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.12.010.
13. Sünter A., Frorip A., Korsakov V., Kurruk R., Kuznetsov A., Ots-Rosenberg M. Optical method for screening and a new proteinuria focus group // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. 2015. C. 236–247. doi: 10.18287/JBPE-2015-1-4-236.
14. Kuznetsov A. et al. Fast Protein and Metabolites (Nucleotides and Nucleosides) Liquid Chromatography Technique and Chemical Sensor for the Assessment of Fish and Meat Freshness // *Chemosensors*. 2023. 11. № 1. C. 69. doi: 10.3390/chemosensors11010069.
15. A. Kuznetsov et al., “Optical Chemical Sensor Based on Fast-Protein Liquid Chromatography for Regular Peritoneal Protein Loss Assessment in End-Stage Renal Disease Patients on Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis,” *Chemosensors*, vol. 10, no. 6, p. 232, 2022.
16. Walls D., Loughran S. T. *Protein chromatography: Methods and protocols* / edited by Dermot Walls and Sinéad T. Loughran. New York, N.Y.: Humana Press, 2011. T.681. ISBN 9781607619123.
17. Determann H. *Gel Chromatography Gel Filtration · Gel Permeation · Molecular Sieves: A Laboratory Handbook*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1969. ISBN 978-3642950841.

18. Konoplev G. et al. Simple Chromatographic Sensor with UV LED Optical Detection for Monitoring Patients Treated with Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. // Eng. Proc. 2023. 35, C. 25. doi: 10.3390/IECB2023-14595.

Информация об авторах

Георгий Асадович Коноплев – доцент, к.т.н.,

SPIN-код: 8662-8929

Артур Иванович Кузнецов – научный сотрудник, д.ф.-м.н.

Вадим Корсаков – директор Jeko Disain OÜ

Оксана Сергеевна Степанова – к.т.н., доцент,

SPIN-код: 7435-1701

Наталия Владимировна Рощина – аспирант

Николай Андреевич Овсянников – аспирант

Даниил Олегович Лялин – аспирант

Никита Сергеевич Лыфарь – студент

Роман Павлович Герасимчук – врач-нефролог, к.м.н.

SPIN-код: 9886-6574

Зарина Марифовна Рустамова – врач-нефролог

Алина Николаевна Исачкина – заведующая отделением диализа, к.м.н.

SPIN-код: 8271-1340

Александр Фрорип – технический директор Ldiamon AS, к.ф.-м.н.

Monitoring of peritoneal protein loss in patients with end-stage renal disease

G. A. Konoplev¹, A.I. Kuznetsov², V. Korsakov³, O.S. Stepanova¹, N.V. Roschina¹, N.A. Ovsyannikov¹, D.O. Lyalin¹, N.S. Lyfar¹, R.P. Gerasimchuk⁴, Z.M. Rustamova⁵, A.N. Isachkina⁵, A. Frorip²

¹ St. Petersburg State Electrotechnical University "LETI" (Saint Petersburg, Russia)

² Ldiamon AS (Tartu, Estonia)

³ Jeko Disain OÜ (Tartu, Estonia)

⁴ Saint-Petersburg City Mariinsky Hospital (Saint Petersburg, Russia)

⁵ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Saint Petersburg, Russia)

Contact address: gakonoplev@etu.ru

Abstract

Chronic kidney disease is one of the leading causes of morbidity and mortality among non-communicable diseases in the developed world. Life support in patients with end-stage renal disease (ESRD) inevitably requires some form of renal replacement therapy, i.e., a kidney transplant, chronic hemodialysis (HD), automated peritoneal dialysis (APD), or continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). The last method is preferable in particular situations because it could be performed at home without medical assistance or special equipment. Unfortunately, CAPD is always accompanied by an undesirable loss of protein with peritoneal dialysate. In this context the safety and efficacy of CAPD could be sufficiently improved by regular assessment of total protein content in effluent dialysate.

The aim of this research is the development of a point-of-care testing (POCT) device for monitoring peritoneal protein loss in ESRD patients on CAPD in out of laboratory conditions (at home or in small hospitals without immediate access to a certified clinical laboratory).

An affordable, simple, and easy-to-use optical chemical sensor based on fast protein liquid chromatography (FPLC) with UV LED photometric detection at a wavelength of 285 nm was designed and manufactured for rapid determination of total protein in effluent peritoneal dialysate. The sensor incorporates the PD-10 chromatographic mini-column for molecular separation: the column

can be regenerated and re-used up to several hundred times. The analytical procedure is relatively simple, taking about 10–15 minutes, and can potentially be performed by the patients themselves or nursing staff without laboratory training.

The algorithms and specialized software which provides functionality for the control of the sensor operation, photometric data acquisition, preprocessing and analysis of dialysate chromatograms, calibration of the sensor, and daily peritoneal protein loss assessment was developed and tested.

Preliminary clinical trials demonstrated a good agreement between data obtained using the sensor and the results of biochemical analysis in the hospital laboratory; the average relative error was about 10%, which is comparable with routine clinical and laboratory methods. The developed device and software can be implemented in practical healthcare to monitor the condition of ESRD patients receiving CAPD treatment, as a prototype for creating fully functional POCT diagnostic systems for home and hospital use.

Keywords

Optical chemical sensor; fast protein liquid chromatography; deep UV LED; peritoneal dialysis; end stage renal disease; peritoneal protein loss; point-of-care testing