

ID: 2014-01-1276-A-3317

Оригинальная статья

Горемыкин И.В., Краснова Е.И., Дерюгина Л.А., Захарова Н.Б.

## Оценка активности хронического обструктивного пиелонефрита у детей с врожденным мегауретером с использованием биомаркеров воспаления, ангиогенеза и фиброгенеза

*ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии*

### Введение

Пороки развития органов мочевыделительной системы (МВС) составляют 9,3% - 24% от общего количества выявленных пороков плода [1]. Обструктивные уропатии являются основной причиной развития почечной недостаточности у детей, особенно грудного и раннего возраста [2].

Общепринятыми критериями тяжести уродинамической обструкции у пациентов с обструктивными уропатиями являются степень дилатации мочевых путей, активность пиелонефрита и состояние почечной функции. Оценка активности хронического обструктивного пиелонефрита у пациентов с врожденным мегауретером обеспечивает правильный выбор лечебной тактики, поскольку своевременно предпринятое хирургическое лечение предотвращает прогрессирование нефросклеротического процесса, а процент спонтанного разрешения мегауретера при отсутствии воспалительного процесса по данным разных авторов достигает 83% [3, 4]. Арсенал современных диагностических методов включает большое количество лабораторных, инструментальных и рентгенологических исследований, многие из которых являются инвазивными, требуют применения общего обезболивания у новорожденных и детей раннего возраста. Вместе с тем данный контингент пациентов с урологической патологией требует проведения неинвазивного мониторинга состояния МВС [5]. Изложенное выше делает проблему разработки неинвазивных и эффективных диагностических методов оценки активности хронического обструктивного пиелонефрита у детей с врожденным мегауретером особенно актуальной.

В настоящее время известно, что для диагностики активности воспалительного процесса может быть использовано лабораторное исследование провоспалительных цитокинов и хемокинов в биологических жидкостях, а для оценки ишемии почечной паренхимы – анализ экскреции фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor – VEGF) и матричных металлопротеиназ (ММП) [6, 7]. Опубликованы данные о том, что концентрацию некоторых из медиаторов воспалительного процесса можно определять и в моче, хотя исследования подобного рода весьма фрагментарны. Вместе с тем именно неинвазивные методы количественного анализа цитокинов наиболее перспективны при разработке современных лабораторных технологий ранней диагностики обострений воспалительного процесса у детей с обструктивными уропатиями, оценки тяжести уродинамической обструкции и прогноза развития хронической почечной недостаточности.

**Целью** исследования является определение диагностической значимости уровня биомаркеров воспаления (интерлейкин-1 $\beta$ ), ангиогенеза (васкулоэндотелиальный фактор роста) и фиброгенеза (моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1, матриксная металлопротеиназа-9) в моче детей с врожденным мегауретером для оценки активности хронического обструктивного пиелонефрита и риска развития нефросклеротических осложнений.

### Материалы и методы

Проведено комплексное обследование 47 детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером в возрасте от 1 мес. до 11 лет (медиана 7 мес., нижний квартиль 3 мес., верхний квартиль 2 года), находившихся на лечении в детской хирургической клинике ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения России. Распределение пациентов по полу, возрасту и диагнозу представлено в таблице 1.

Исследование проводилось при получении информированного согласия родителей ребенка в соответствии со ст. 22 и ст. 54 Федерального Закона «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации» (N 323-ФЗ).

Из исследования были исключены: дети с клапанами задней уретры и сочетанием нерефлюксирующего и рефлюксирующего мегауретера, больные с множественными пороками развития, требующие хирургического лечения, пациенты с интеркуррентными формами воспалительного процесса.

Показаниями для госпитализации на амбулаторном этапе служили: пренатальная ультразвуковая диагностика врожденного порока развития мочевыделительной системы (27 детей, 54,5%), мочевого синдрома в виде лейкоцитурии (28 детей, 59,6%), гематурии (2 ребенка). При этом у 9 детей (19%) до госпитализации отмечено непрерывно-рецидивирующее течение пиелонефрита, сопровождавшееся типичными для обострения пиелонефрита у детей раннего возраста клиническими симптомами (фебрильная температура, вялость, отказ от еды, беспокойство при мочеиспускании, мутная моча).

Верификация диагноза проводилась на основании стандартного комплекса урологического обследования, включавшего в себя: сбор жалоб и анамнеза, клинический осмотр, проведение лабораторных исследований крови и мочи, ультразвуковые исследования почек и мочевого пузыря с доплерометрией, рентгенологические исследования (экскреторная урография, динамическая нефросцинтиграфия, компьютерная томография органов брюшинного пространства с контрастным усилением, микционная цистоуретрография).

Функция мочевого пузыря оценивалась на основании ритма спонтанных мочеиспусканий с использованием квалитетических таблиц Е.Л. Вишневого.

Исследование сократительной функции расширенного мочеточника (ультразвуковая уретеропельвиометрия с оценкой частоты сокращения мочеточника в 1 минуту) выполнено 47 пациентам на аппаратах «SimensSonolineG-40» и «Aloka 1700» совместно со специалистом ультразвуковой диагностики.

Исследование выполняли на фоне оральной гидратации (10 мл/кг) за 30-40 мин. до исследования, у детей грудного возраста – через 30-40 мин. после кормления.

При нативном ультразвуковом исследовании оценивали объем мочевого пузыря, диаметр мочеточника в дистальном отделе, площадь чашечно-лоханочного комплекса. Затем в процессе сканирования дистального отдела мочеточника фиксировали количество сокращений мочеточника за 1 минуту. Оценивали как полные сокращения (до смыкания стенок мочеточника), так и

неполные (на  $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{3}$  диаметра мочеточника). Нормальная частота спонтанных сокращений мочеточника составляет от 2 до 7 в минуту, а при стимуляции фуросемидом возрастает до 4 и более в минуту [8]. Снижение частоты спонтанных сокращений меньше нормы отмечено у 9 детей (19%), у остальных пациентов наблюдалась нормальная сократительная функция (3-7 сокращений в минуту).

Использование диуретической стимуляции (0,5 мг/кг фуросемида внутримышечно) и повторное исследование через 15, 30 и 45 минут после введения диуретика в качестве провокационной пробы позволило выделить группу из 9 детей с низкой сократительной функцией мочеточника (средняя частота сокращения мочеточника на протяжении исследования от 0 до 3,5 в мин.), и группу из 38 пациентов с нормальной сократительной функцией мочеточника (4-7,6 в мин.).

Для оценки активности воспаления, ангиогенеза и фиброгенеза в мочевых путях у 47 детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером было выполнено исследование в моче уровня биомаркеров воспаления – интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); фиброгенеза – моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), ангиогенного фактора – фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), и фермента матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9).

Для проведения исследования при наличии ультразвуковых признаков врожденного мегауретера выполняли сбор мочи путем свободного мочеиспускания после осуществления гигиенических процедур в стерильный пластиковый контейнер с крышкой.

Затем проба мочи центрифугировалась при 3000 об./мин. в течение 15 минут (на центрифуге ЦЛМН-P10-01-«Элекон»), а надосадочная жидкость замораживалась и хранилась при -18 $^{\circ}$ C в полипропиленовых пробирках до проведения анализа.

Непосредственно перед исследованием образцы биоматериала размораживались при комнатной температуре, перемешивались и снова центрифугировались при 3000g в течение 5 минут на микроцентрифуге Elmi (SkyLine, Латвия).

Исследование содержания биомаркеров в моче проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия) и «BenderMedSystems» (Австрия) на иммуноферментном анализаторе «Stat-Fax 2010» (США).

Содержание определяемых VEGF, MCP-1, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  выражалось в пг/мл, а содержание MMP-9 – в нг/мл.

Для статистического анализа результатов исследования биомаркеров в моче детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером была создана группа сравнения, в которую вошли 20 детей с малой хирургической патологией (пупочной и паховой грыжей), стратифицированные по возрасту и полу. Средний возраст детей в группе сравнения составил  $1,5 \pm 1,2$  года. Соотношение мальчиков и девочек 3:1.

Статистический анализ данных проводили с помощью пакетов прикладных программ MicrosoftOfficeExcel (MicrosoftCorporation) и StatisticaforWindowsv6.0 (StatSoft-Russia). Все анализируемые признаки были разделены на количественные (непрерывные и дискретные), и качественные (номинальные, порядковые, бинарные). Анализ вида распределения количественных признаков проводился с использованием критерия Шапиро-Уилка.

Учитывая, что большинство анализируемых признаков имели распределение, отличное от нормального, при статистической обработке данных пользовались в основном непараметрическими методами описательной статистики (расчет медианы, интерквартильного размаха), корреляционного анализа (метод гамма-корреляции). Для сравнения двух независимых групп использовали критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

Для оценки диагностической эффективности методов лабораторного исследования биомаркеров воспаления, ангиогенеза и фиброгенеза в моче проводили построение и анализ характеристической кривой (Receiver Operator Characteristic, ROC-анализ) с использованием программного обеспечения SPSS 13.0 forWindows (SPSSInc.) при разных точках разделения показателей. Информативность показателя оценивали по величине площади под кривой (AUC). Чем ближе кривая к диагонали (AUC=0,5), тем ниже диагностическая ценность показателя, чем ближе площадь под кривой к 1, тем эффективнее диагностический тест.

## Результаты

При сравнительном анализе результатов исследования уровня биологических маркеров в моче отмечены достоверные различия основной группы и группы сравнения для VEGF ( $p < 0,0000001$ ), MCP-1 ( $p < 0,04$ ), IL-1 $\beta$  ( $p < 0,003$ ). Не получено достоверных различий для MMP-9 ( $p > 0,8$ ).

При оценке жалоб, результатов стандартных лабораторных и инструментальных методов исследования у пациентов с различной сократительной функцией мочеточника обнаружены достоверные различия групп по основным критериям тяжести уродинамической обструкции: степени активности воспаления, дилатации мочевых путей и показателям почечной гемодинамики. Последнее подтверждает патогенетическую обоснованность выделения группы пациентов с нарушенной сократительной функцией мочеточника и ставит нарушение сократительной функции мочеточника в один ряд с другими критериями тяжести уродинамической обструкции у пациентов с врожденным нерефлюксирующим мегауретером.

Анализируя активность воспаления у пациентов основной группы, мы отметили, что уровень IL-1 $\beta$  в моче коррелировал с лабораторными показателями пиелонефрита (лейкоцитурия, лейкоцитоз). Наиболее тесная корреляция отмечена с лейкоцитозом крови (коэффициент корреляции  $\gamma = 0,8073$ ,  $p = 0,00007$ ).

Пациенты с тяжелыми уродинамическими нарушениями (выраженная дилатация мочевых путей, низкая сократительная функция мочеточника) имели высокий уровень IL-1 $\beta$  в моче. У детей с непрерывно-рецидивирующим течением пиелонефрита уровень IL-1 $\beta$  был достоверно выше. Этапное хирургическое лечение и неудовлетворительный его результат (неполное восстановление уродинамики мочевых путей) также сопровождалось высокими уровнями IL-1 $\beta$  в моче. Таким образом, уровень IL-1 $\beta$  в моче явился интегративным показателем активности пиелонефрита у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером. Для оценки эффективности использования IL-1 $\beta$  в качестве критерия активности пиелонефрита у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером проведен ROC-анализ.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является основным маркером повреждения сосудистого русла в процессе ремоделирования почечной паренхимы при ишемии и нефросклерозе. Результаты исследования показали, что уровень VEGF коррелировал с состоянием подкапсульного кровотока ( $N = 31$ ,  $\gamma = 0,9310$ ,  $p < 0,01$ ).

Мощным профиброгенным фактором является моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1), который стимулирует трансдифференцировку тубулярных клеток почечной паренхимы в миофибробласты с продукцией ими провоспалительных и

просклеротических факторов. Повышение в моче уровня MCP-1 отражает выраженность клеточной воспалительной инфильтрации с усилением процессов фиброобразования в интерстициальной ткани почки. Нами установлена корреляционная связь уровня MCP-1 в моче и рентгенологической стадии мегауретера по Н.А. Лопаткину ( $N=47$ ,  $\gamma=0,4399$ ,  $p<0,0006$ ). При сравнении уровня MCP-1 в моче детей с разными рентгенологическими стадиями мегауретера с использованием U-критерия Манна-Уитни обнаружены достоверные различия уровня MCP-1 в группе уретерогидронефроза (III стадия) по сравнению с I и II стадиями мегауретера ( $p<0,006$ ). Кроме того, уровень MCP-1 также коррелировал с состоянием подкапсульного кровотока ( $N=31$ ,  $\gamma=0,9286$ ,  $p<0,05$ ).

Нарушение подкапсульного кровотока носит необратимый характер и является признаком начавшегося нефросклероза, в то время как изменения паренхиматозного кровотока, особенно на дуговых сосудах, носят транзиторный характер и обусловлены дилатацией чашечно-лоханочного комплекса и повышенным внутрилоханочным давлением. В связи с этим, полученные данные не позволяют считать повышение уровней VEGF и MCP-1 в моче детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером ранним признаком нарушения почечной гемодинамики, однако оно является критерием начавшегося необратимого нефросклеротического процесса.

Для оценки эффективности использования лабораторного исследования уровня VEGF мочи в диагностике необратимого повреждения почечной паренхимы при мегауретере был проведен ROC-анализ с построением характеристической кривой.

Особого внимания заслуживает изучение экскреции матриксной металлопротеиназы-9 у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером, что обусловлено ее многочисленными протеолитическими и непротеолитическими свойствами [9], а также участием в процессах клеточной миграции и дифференцировки, метанефрогенезе [10].

Мы обнаружили значительное повышение уровня экскреции MMP-9 у пациентов с нарушенной сократительной функцией мочеточника, а также тесную корреляцию параметров сократительной активности мочеточника с уровнем экскреции MMP-9 ( $N=47$ ,  $\gamma=-0,9143$ ,  $p<0,000002$ ).

При сравнении подгрупп пациентов с нормальной и сниженной сократительной функцией мочеточника получены существенные различия в уровне экскреции MMP-9 (рисунок 2). При проведении статистического анализа с использованием U-критерия Манна-Уитни выявлено, что различия в уровне MMP-9 между группами с различной сократительной функцией мочеточника достоверны ( $p<0,00007$ ).

Эффективность дифференциальной диагностики вариантов врожденного нерефлюксирующего мегауретера с различной сократительной функцией по анализу чувствительности и специфичности оценивали с помощью построения характеристической кривой (ROC-анализ).

#### Обсуждение

Результаты исследования подтвердили данные других авторов о высокой диагностической эффективности использования IL-1 $\beta$  в качестве критерия активности пиелонефрита у детей с врожденными пороками развития мочевыделительной системы [6, 7]. Аналогичные результаты получены и в отношении маркеров ишемии и нефросклероза (VEGF, MCP-1, MMP-9). Ранее уже приводились результаты подобных исследований у взрослых пациентов с хроническим гломерулонефритом [9], у детей с рефлюкс-нефропатией [7].

Новые данные получены нами в отношении уровня MMP-9 у пациентов с различной сократительной функцией мочеточника при мегауретере. Результаты настоящей работы заставляют задуматься о возможной патогенетической роли MMP-9 в регуляции сократительной функции мочеточника у пациентов с врожденным нерефлюксирующим мегауретером на этапах эмбрионального и постнатального развития.

#### Выводы

Метод лабораторного исследования уровня IL-1 $\beta$  в моче обладает высокой эффективностью для диагностики активности пиелонефрита у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером на этапах наблюдения и лечения.

Исследование мочевых уровней VEGF и MCP-1 может быть использовано для мониторинга состояния почечной гемодинамики и активности нефросклероза, однако данное исследование информативно лишь для диагностики необратимых нарушений подкапсульного кровотока. В то же время в нашем исследовании доплерография сосудов почек явилась более чувствительным методом для диагностики транзиторных нарушений паренхиматозного кровотока, обусловленных резкой дилатацией чашечно-лоханочного комплекса.

Одним из критериев тяжести уродинамической обструкции может считаться нарушение сократительной функции мочеточника врожденного или приобретенного генеза, поскольку группы пациентов с различной сократительной функцией мочеточника достоверно отличались по степени дилатации мочевых путей и активности пиелонефрита.

Для диагностики состояния сократительной функции мочеточника высокой чувствительностью и специфичностью обладает метод неинвазивного мониторинга уровня MMP-9 мочи.

#### Конфликт интересов

Работа выполнена в рамках научного направления НИР отдела детской урологии, андрологии и центральной научно-исследовательской лаборатории НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии.

#### Библиографический список.

1. Айламазян Э. К., Баранов В. С. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней. М. : МЕДпресс-информ, 2006. 416 с.
2. Леонова Л. В. Патологическая анатомия врожденных обструктивных уротатий у детей : автореф. ... доктора мед. наук. М., 2009. 54 с.
3. Shukla A. R., Cooper J., Patel R. P. et al. Prenatally detected primary megaureter: a role for extended followup // J. urol. 2005. Vol. 173, № 4. P. 1353-1356.
4. Arena S., Magno C., Montalto A. S. et al. Long-term follow-up of neonatally diagnosed primary megaureter: Rate and predictors of spontaneous resolution // Scand J Urol Nephrol. 2012. Vol. 46, № 3 P. 201-7.
5. Дифференциальный подход к лечению нерефлюксирующего мегауретера у новорожденных / М. В. Левицкая, Н. В. Голоденко, Т. В. Красовская [и др.] // Детская хирургия. 2003. № 6. С. 22-25.

6. Морозова О. Л. Патогенетическое обоснование принципов диагностики, прогнозирования развития и профилактики хронического обструктивного пиелонефрита у детей в периоперационном периоде : дис. ... доктора мед. наук, Саратов, 2010. 300 с.
7. Лакомова Д. Ю. Ранняя диагностика и прогнозирование нефросклероза у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом : дис. ... канд. мед. наук. Саратов, 2011. 210 с.
8. Сабирзянова З. Р. Нарушения сократительной способности мочеточника при обструктивном мегауретере и возможности их коррекции у детей раннего возраста : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.19. М., 2004. 137 с.
9. Ли О. А. Клиническое значение определения матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в ткани почки и моче при хроническом гломерулонефрите : автореф. дис. ...канд. мед. наук. М., 2011. 25 с.
10. Arnould C., Lelièvre-Pégorier M., Ronco P. et. al. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development // J. Am Soc Nephrol. 2009. Vol. 20 (10). P. 2171-80.
11. Мамбетова А. М., Жетищев Р. А., Шабалова Н. Н. Фактор некроза опухоли  $\alpha$  и интерлейкин-1 $\beta$  у детей с врожденными пороками органов мочевой системы на фоне разных степеней тяжести недифференцированной дисплазии соединительной ткани // Цитокины и воспаление. 2011. Т. 10, № 3. С. 61-68.