

УДК 616.617-007.63-056.7-053.2:616.62-008.224-037-07(045)

## ОЦЕНКА ТЯЖЕСТИ УРОДИНАМИЧЕСКОЙ ОБСТРУКЦИИ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМ МЕГАУРЕТЕРОМ НА ОСНОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМАРКЕРОВ МОЧИ

<sup>1</sup>Краснова Е.И., <sup>1</sup>Дерюгина Л.А., <sup>1</sup>Захарова Н.Б., <sup>2</sup>Федорова И.А.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения России», Саратов, e-mail: krasnovasaratov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Выполнено исследование уровней биомаркеров воспаления (интерлейкин-1 $\beta$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$ , моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1), ангиогенеза (васкулоэндотелиальный фактор роста) и фиброгенеза (матриксная металлопротеиназа-9) в моче 47 детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером. Установлено, что уровень IL-1 $\beta$  в моче коррелировал с основными лабораторными критериями воспаления и явился интегративным показателем активности пиелонефрита. Обнаружена связь уровней ангиогенного фактора VEGF и профиброгенного MCP-1 с показателями почечной гемодинамики, что позволило считать повышение уровней данных факторов в моче признаком ишемии почечной паренхимы на фоне тубулоинтерстициального воспаления. Уровень MMP-9 коррелировал с параметрами сократительной функции мочеоточника. Его повышение достоверно отличало группу детей с нарушенной сократительной функцией мочеоточника. Достоверных данных о диагностической значимости определения TNF- $\alpha$  в моче детей с врожденным мегауретером не получено.

**Ключевые слова:** врожденный нерефлюксирующий мегауретер, интерлейкин-1 $\beta$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$ , васкулоэндотелиальный фактор роста, моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1, матриксная металлопротеиназа-9

## THE DIAGNOSIS OF THE URODYNAMIC OBSTRUCTION SEVERITY IN CHILDREN WITH CONGENITAL MEGAURETER USING THE STUDY OF URINARY BIOMARKERS

<sup>1</sup>Krasnova E.I., <sup>1</sup>Deryugina L.A., <sup>1</sup>Zakharova N.B., <sup>2</sup>Fedorova I.A.

<sup>1</sup>Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: krasnovasaratov@yandex.ru;

<sup>2</sup>National Research Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, Saratov

We have done the analysis of the urine biomarkers of inflammation (interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein-1), angiogenesis (vascular endothelial growth factor) and fibrogenesis (matrix metalloproteinase-9) in 47 children with congenital nonrefluxing megaureter. The correlation between the urine level of IL-1 $\beta$  and main laboratory criteria of inflammation occurred, so IL-1 $\beta$  as an integrative indicator of pyelonephritis activity was appeared. The relation between levels of VEGF and MCP-1 and indicators of renal hemodynamics allowed to consider increased levels of these factors as markers of the ischemia of the renal parenchyma, induced tubulointerstitial inflammation and fibrosis. The urine level of MMP-9 was strongly correlated with parameters of peristaltic activity of the ureter. The group of children with lower peristaltic activity of the megaureter was significantly different from group with normal ureteral peristalsis by the high urine level of MMP-9. We do not have reliable data about the diagnostic value of determination of the urine level of TNF- $\alpha$  in children with congenital megaureter.

**Keywords:** congenital nonrefluxing megaureter, interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, monocyte chemoattractant protein-1, matrix metalloproteinase-9

Врожденный нерефлюксирующий мегауретер, объединяющий различные варианты обструкции мочеоточника, представляет наиболее частую нозологию в структуре обструктивных уропатий, учитывая многообразие его клинических форм от минимального расширения дистального отдела мочеоточника с благоприятным течением до тяжелого двустороннего уретерогидронефроза с нарушением функции почек.

Признаки тяжелой уродинамической обструкции мочеоточника, т.е. активное течение пиелонефрита, нарушение почечной гемодинамики и выраженная дилатация мочевых путей, служат показанием к хирургическому лечению и в настоящее вре-

мя. Однако, учитывая многочисленные литературные данные о высокой частоте спонтанной резолюции врожденного мегауретера [4], проблема диагностики тяжести обструкции мочеоточника становится все более актуальной

Диагностические мероприятия, в большинстве своем носящие инвазивный характер, имеют ограничения в использовании у детей раннего возраста. В то же время применение современных лабораторных технологий позволяет осуществлять мониторинг состояния мочевыделительной системы ребенка, начиная с рождения.

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 матриксных металлопротеиназ (ММП) [1, 2]. 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 оценки тяжести уродинамической обструкции и прогноза развития хронической почечной недостаточности.

**Цель исследования:** определить клиническую значимость исследования био-

маркеров воспаления (интерлейкин-1 $\beta$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$ ), ангиогенеза (васкулоэндотелиальный фактор роста) и фиброгенеза (моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1, матриксная металлопротеиназа-9) в моче для оценки тяжести уродинамической обструкции мочеточника у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером.

### Материалы и методы исследования

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 «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения России». Распределение пациентов по полу, возрасту и диагнозу представлено в табл. 1.

**Таблица 1**

Распределение больных по полу, возрасту и диагнозу ( $n = 47$ )

Возраст \ Пол	Односторонний МУ ( $n = 34$ )		Двусторонний МУ ( $n = 7$ )		КЗУ + двусторонний МУ ( $n = 3$ )		МУ единственной почки ( $n = 3$ )	
	М	Д	М	Д	М	Д	М	Д
2 нед.–12 мес.	14	5	4	3	2	-	1	-
1–5 лет	11	2	-	-	1	-	1	-
> 6 лет	2	-	-	-	-	-	-	1

**Примечание:** М – мальчики, Д – девочки. Односторонний МУ – односторонний мегауретер, двусторонний МУ – двусторонний мегауретер, КЗУ+двусторонний МУ – двусторонний мегауретер в составе симптомокомплекса клапанов задней уретры, МУ единственной почки – мегауретер единственной почки.

Всем детям проведен стандартный комплекс урологического обследования: 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 брюшного пространства с контрастным усилением, микционная цистоуретрография).

Исследование сократительной функции расширенного мочеточника (ультразвуковая уретеропельвиометрия с оценкой частоты сокращения мочеточника в 1 минуту) выполняли на фоне оральной гидратации (10 мл/кг) за 30–40 мин до исследования, у детей грудного возраста – через 30–40 мин после кормления. Оценивали объем мочевого пузыря, диаметр мочеточника в дистальном отделе, площадь чашечно-лоханочного комплекса, количество сокращений мочеточника за 1 минуту. Нормальная частота спонтанных сокращений мочеточника составляет от 2 до 7 в минуту, а при стимуляции фуросемидом возрастает до 4 и более в минуту [3]. 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 $\beta$ ), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); фиброгенеза – моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), ангиогенного фактора – фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), и фермента матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9). Исследование содержания биомаркеров в моче проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия) и «Bender MedSystems» (Австрия) на иммуноферментном анализаторе «Stat-Fax 2010» (США). 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.

Статистический анализ данных проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation) и Statistica for Windows v6.0 (StatSoft-Russia). Анализ вида распределения количественных признаков проводился с использованием критерия Шапиро-Уилка. Использовали методы описательной статистики, непараме-

трические методы корреляционного анализа (гамма-корреляция), сравнение двух независимых групп с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ . Для оценки диагностической эффективности методов лабораторного исследования биомаркеров мочи проводили построение и анализ характеристической кривой (Receiver Operator Characteristic, ROC-анализ) с использованием программного обеспечения SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc.). 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 исследования и их обсуждение

При сравнительном анализе результатов исследования уровня биологически 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 TNF- $\alpha$  ( $p > 0,06$ ) и MMP-9 ( $p > 0,8$ ) (табл. 2).

При оценке жалоб, результатов стандартных лабораторных и инструментальных методов исследования у пациентов с различной сократительной функцией мочевого пузыря обнаружены достоверные различия групп по основным критериям тяжести уродинамической обструкции: степени активности воспаления, дилатации мочевых путей и показателям почечной гемодинамики. Последнее доказывает патогенетическую обоснованность дифференциации вариантов мегауретера по состоянию сократительной функции мочевого пузыря.

Таблица 2

Сравнительный анализ уровня биомаркеров мочи детей основной группы и группы сравнения

Биомаркеры	Основная группа (N = 47)			Группа сравнения (N = 20)			
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ	*p-level
VEGF	185,4	85,95	303,3	45,4	39,05	60,25	< 0,0000001
MCP-1	85,9	51,2	140,1	51,5	17,55	113,55	< 0,04
TNF- $\alpha$	2,0	0,745	2,0	3,74	1,315	7,37	> 0,06
IL-1 $\beta$	1,0	1,0	1,0	2,325	1,325	3,265	< 0,003
MMP-9	2,0	0,6	2,1	2,0	1,7	2,45	> 0,8

Примечание: Me – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль, \*p-level – критерий достоверности различий, вычисленный методом сравнения двух независимых групп с использованием U-критерия Манна-Уитни.

В ходе анализа активности воспаления у пациентов основной группы установили, 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 мочевого пузыря), непрерывно-рециди-

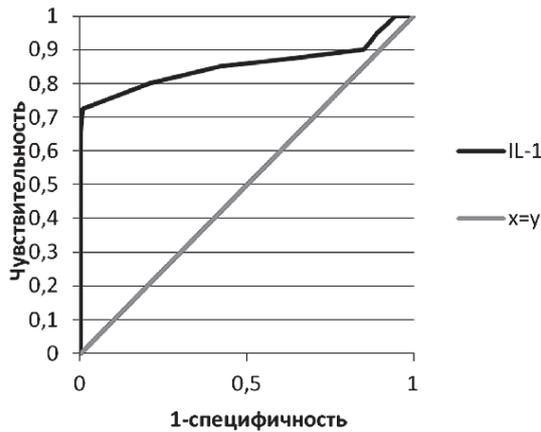
вирующим течением пиелонефрита имели высокий уровень IL-1 $\beta$  в моче. Таким образом, уровень IL-1 $\beta$  в моче явился интегративным показателем активности пиелонефрита у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером. Для оценки эффективности использования IL-1 $\beta$  в качестве критерия активности пиелонефрита у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером проведен ROC-анализ. Результаты анализа представлены в табл. 3 и на рисунке (а).

Таблица 3

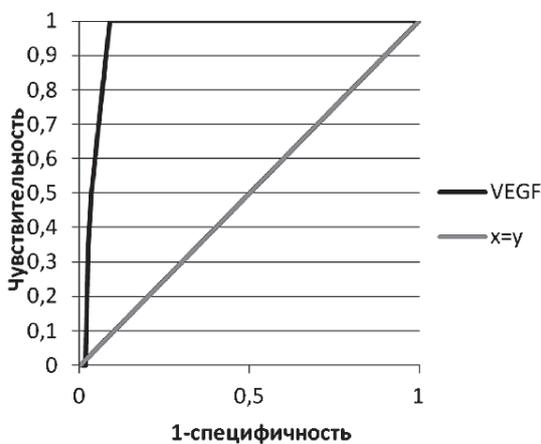
Результаты ROC-анализа для IL-1 $\beta$ , VEGF и MMP-9

Показатель	AUC	$p$	95% ДИ	Cut off	Чувствительность	Специфичность
IL-1 $\beta$	0,869 $\pm$ 0,093	< 0,0001	0,687-1,051	1,3 пг/мл	80%	97%
VEGF	0,966 $\pm$ 0,034	< 0,03	0,899-1,032	508,85 пг/мл	100%	96,6%
MMP-9	0,971 $\pm$ 0,026	< 0,0001	0,921-1,022	5,7 нг/мл	100%	94,9%

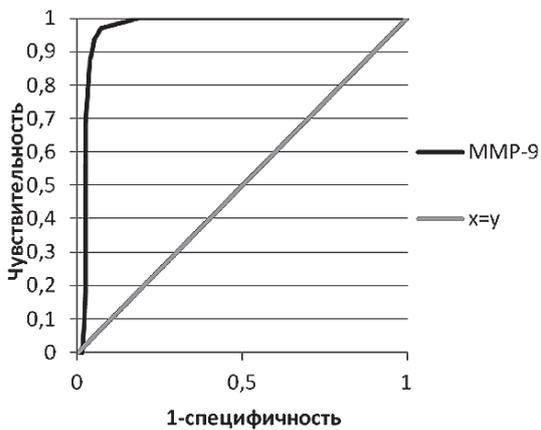
Примечание: AUC – площадь под кривой,  $p$  – коэффициент достоверности ( $p < 0,05$ ), 95% ДИ – 95% доверительный интервал для значения площади, Cut off – точка разделения показателей на два класса.



а



б



в

*Чувствительность и специфичность метода лабораторного исследования биомаркеров мочи IL-1β (а), VEGF (б) и MMP-9 (в) для диагностики активности пиелонефрита, ишемии почки, нефросклероза и нарушения сократительной функции мочеточника соответственно*

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является основным маркером повреждения сосудистого русла в процессе ремоделиро-

вания 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. Выявлена корреляционная связь уровня MCP-1 в моче и стадии рентгенологических изменений 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 ( $N = 31, \gamma = 0,9286, p < 0,05$ ). Результаты ROC-анализа для MCP-1 представлены в табл. 3 и на рисунке (б).

Особого внимания заслуживает изучение экскреции матриксной металлопротеиназы-9 у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером, что обусловлено ее многочисленными протеолитическими и непротеолитическими свойствами, а также участием в процессах клеточной миграции и дифференцировки, метанефрогенезе [5].

В результате исследования выявлена взаимосвязь параметров сократительной функции мочеточника с уровнем экскреции MMP-9 ( $N = 47, \gamma = -0,9143, p < 0,000002$ ). 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). Результаты анализа представлены в табл. 3 и на рисунке (в).

**Выводы**

Исследование уровня IL-1β в моче обладает высокой диагностической значимостью для оценки активности пиелонефрита у детей с врожденным нерефлюксирующим мегауретером на этапах наблюдения и лечения. Исследование мочевых уровней VEGF

и МСР-1 может быть использовано для мониторинга состояния почечной гемодинамики и активности тубулоинтерстициального воспаления. Для диагностики состояния сократительной функции мочеточника высокой чувствительностью и специфичностью обладает метод неинвазивного мониторинга уровня ММР-9 мочи.

#### Список литературы

1. Морозова О.Л. Изменения цитокинового профиля у детей с обструктивными уropатиями / Д.А. Морозов, А.А. Свистунов, О.Л. Морозова, В.В. Моррисон // Материалы I Российского съезда детских урологов. – М., 2008. – С. 16–17.
2. Лакомова Д.Ю. Биомаркеры воспаления у детей с обструктивными уropатиями / Д.А. Морозов, О.Л. Морозова, Д.Ю. Лакомова и др. // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9. – № 2. – С. 69–74.
3. Сабирзянова З.Р. Казанская И.В., Мудрая И.С. и др. Диуретическая сонография как метод оценки уродинамики при различных формах обструктивного мегауретера у детей раннего возраста // Актуальные проблемы педиатрии: материалы IX Конгресса педиатров России. – М., 2004. – С. 176–177.
4. Arena, S. Long-term follow-up of neonatally diagnosed primary megaureter: Rate and predictors of spontaneous resolution / S. Arena, C. Magno, A.S. Montalto et al. // Scand J Urol Nephrol. – 2012. – №46(3). – P. 201–7.
5. Arnould, C. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development / M. Lelièvre-Pégorier, P. Ronco, B. Lelongt // J. Am Soc Nephrol. – 2009. – Vol. 20(10). – P. 2171–80.

#### References

1. Morozova O. Changes in cytokine profile in children with obstructive uropathies / DA Morozov, A.A.Svistunov, O. Morozov, VV Morrison // Proceedings of the I Congress of Russian pediatric urologists. M., 2008. pp. 16–17.
2. Lakomova D. Biomarkers of inflammation in children with obstructive uropathies / D.A. Morozov, O. Morozova, D. Lakomova, etc. // Cytokines and inflammation. 2010. T. 9. no. 2. pp. 69–74.
3. Sabirzyanova Z.R., Kazanskaya I.V., Mudraya I.S. Diuretic sonography as a method of evaluating urodynamics in various forms of obstructive megaureter in young children // Proc. of the IX Congress of pediatricians of Russia «Actual problems of pediatrics». Moscow, 2004. p. 176–177.
4. Arena, S. Long-term follow-up of neonatally diagnosed primary megaureter: Rate and predictors of spontaneous resolution/ S. Arena, C. Magno, A.S. Montalto et al.// Scand J Urol Nephrol. 2012; 46(3):201–7.
5. Arnould, C. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development / M. Lelièvre-Pégorier, P. Ronco, B. Lelongt // J. Am Soc Nephrol. 2009. Vol. 20(10). pp. 2171–80.

#### Рецензенты:

Чураков А.А., д.м.н., директор ООО «Медицинский центр «Врачебная практика», г. Саратов;

Пучиньян Д.М., д.м.н., профессор, заместитель директора по науке ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздравсоцразвития России, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 23.07.2012.