

Н. М. Зайкова

## КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МОЧЕВОЙ ЭКСКРЕЦИИ АНГИОТЕНЗИНА II И ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА-β1 В ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕПЕНИ РЕФЛЮКС-НЕФРОПАТИИ У ДЕТЕЙ

Научно-исследовательский институт Охраны Здоровья Матери и Ребенка Республики Молдова, Кишинев

Целью работы было изучение диагностической значимости TGF-β1 и AngII в качестве лабораторных маркеров для выявления степени выраженности повреждения почечной ткани при ПМР. В группу исследования вошли 71 пациент с различной степенью ПМР в возрасте от 1 года до 14 лет (средний возраст 199,28±11,7 месяцев), из них 52 девочки (73,2%). В зависимости от степени РН по данным ДМСА-сцинтиграфии были определены 3 группы: 1гр – ПМР без РН, 2 гр-легкая степень РН, 3 гр.-ПМР с тяжелой степенью РН. Контрольную группу составили здоровые дети (10 детей), без почечной патологии в анамнезе. Установлено достоверное повышение продукции TGF-β1 и AngII в моче у всех больных с ПМР по сравнению с группой контроля. При высокой степени рефлюкс-нефропатии достоверно повышен уровень данных цитокинов по сравнению с легкой степенью, что подтверждает связь TGF-β1 и AngII с выраженностью склеротических процессов в тубулоинтерстициальной ткани. Проведенный поиск ранних и доступных биомаркеров тубулоинтерстициального фиброза показал, что выбранные метаболиты могут быть использованы в качестве критерия прогрессирования рефлюкс-нефропатии при ПМР.

**Ключевые слова:** TGF-β1, AngII, ПМР, рефлюкс-нефропатия

N.M.Zaicova

### CLINICAL SIGNIFICANCE OF URINARY EXCRETION OF ANGIOTENSIN II AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β1 IN DETERMINING THE DEGREE OF REFLUX NEPHROPATHY IN CHILDREN

The aim of investigation was study to study the diagnostic value of TGF-β1 and AngII as laboratory markers to identify the severity of damage to kidney tissue in the VUR. We observed 71 patients with varying degrees of VUR in the age from 1 year till 14 years (mean age 199,28±11,7 months), including 52 girls (73,2%). Depending on the RN according to DMSA-stsintishgrafii identified three groups: 1g-VUR without RH, 2-gr mild RN, 3 gr.-VUR with severe RH. The control group consisted only of healthy children (10 children), without a nephritic pathology in the anamnesis. The analysis of the received results has revealed the production of the substantial increase TGF – β-1 and AngII in urine at all the patients with VUR in comparison with control group. The TGF-β1/Cr level and Ang II in urine at a high degree of reflux-nephropatii is significantly above in comparison with mild degree reflux nephropathy, which confirms the link TGF-β1 and AngII with the severity of sclerotic processes in tubulointerstitial tissue. Search for available biomarker of early and tubulointerstitial fibrosis shows, that AngII and TGF-β1 can be use as a criterion for the progression of reflux nephropathy in the VUR.

**Key words:** TGF-β1, VUR, reflux-nephropathy

Среди приоритетных направлений современной нефрологии следует выделить совершенствование методов ранней диагностики рефлюкс-нефропатии (РН). В последние годы лабораторная служба обогатилась рядом диагностических тестов, которые могут использоваться в качестве маркеров повреждения почек, в результате наложения инфекции на врожденный или приобретенный пузырно-мочеточниковый рефлюкс (ПМР). Повреждение почечной ткани (гипоксия, обструкция, инфекция) приводит к продукции медиаторов (провоспалительных цитокинов и факторов роста), которые способствуют усиленному притоку лейкоцитов в область повреждения, формированию и последующему поддержанию воспалительного инфильтрата [1,2,3].

В литературе недостаточно освещен вопрос о роли ангиотензина II (AngII) при различных типах патологии почек, особенно при рефлюкс-нефропатии. Являясь основным профиброгенным фактором, инициирующим и поддерживающим процессы фибрилогенеза, AngII обуславливает также образование трансформирующего фактора роста (TGF-β1),

который стимулирует пролиферацию клеток и образование соединительной ткани [4,5,6].

Особое внимание вызывает исследование TGF-β1 и AngII в качестве лабораторных маркеров для выявления степени выраженности повреждения почечной ткани при ПМР, что поможет внести компонент объективности в решении диагностических и лечебных проблем.

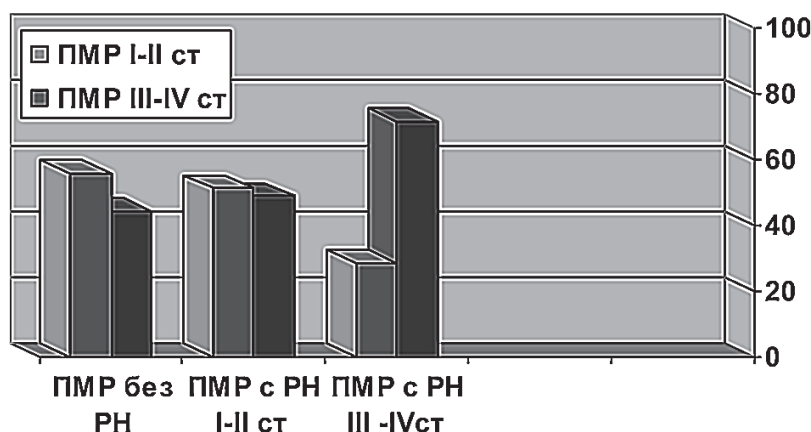


Рисунок 1. Развитие РН в зависимости от степени ПМР у детей.

**Целью настоящего исследования** явилась оценка клинического значения определения мочевого экскреции TGF-β1 и AngII в ранней диагностике рефлюкс-нефропатии у детей с ПМР.

**Материал и методы**

проанализированы результаты исследований, проведенных в период с 2008-2009 в отделениях нефрологии и урологии НИИОЗМиР. В исследование вошел 71 пациент с различной степенью ПМР в возрасте от 1 года до 14 лет (средний возраст 199,28±11,7 месяцев), из них 52 девочки (73,2%). Всем исследуемым была проведена оценка функции почек, для чего использовались результаты ультразвукового исследования, УЗИ-доплер, микционной цистографии, экскреторной урографии и динамической нефросцинтиграфии, анализы крови и мочи, определялся уровень мочевины и креатинина в крови, скорость клубочковой фильтрации по формуле Шварца, а также концентрационную функцию почек в пробе Зимницкого и бактериологическое исследование мочи. Статическая ДМСА-сцинтиграфия была проведена через 3-6 месяцев после установления ПМР или последнего эпизода инфекции мочевых путей в отделении ядерной медицины Республиканской клинической больницы (зав. Карецкая В.В.) Кишинева. Степень рефлюкс-нефропатии определяли согласно классификации Goldraich и соавт. (1984): А – 1-2 рубца, В-2-3 рубца с сохраненной почечной паренхимой, С-очагово-диффузное распространение склеротических очагов с сохраненным почечным контуром, D – «маленькая» или атрофированная почка [7].

Совокупность полученных нефросцинтиграфических изменений по данным ДМСА-сцинтиграфии позволила разделить пациентов на группы в зависимости от степени тяжести РН. Среди 71 больных (142 почки), в 18 исследованных почках у детей с ПМР не было выявлено очагов склероза, в 54 почках были выявлены тип А и В рубцов при I-II степени ПМР и в 28 почках при III-V степени ПМР и часто рецидивирующим течением пиелонефрита. В 20 почках с III-V степенью ПМР определяли тип С и D рубцов и 22 почках тип В и D рубцов. В зависимости от степени РН мы объединили пациентов в следующие группы: 1 гр.- ПМР без РН (9 детей) – отсутствие очагов склероза, 2 гр.- I-II (легкая) степень РН (41 пациент) – тип А и тип В с обеих сторон, 3 гр.-III-IV (тяжелая) степень РН (21 пациент)-тип В, С и D рубцов с обеих сторон.

В утренней моче определяли экскрецию TGF-β1 и AngII методом иммуноферментного анализа (ELISA) и уровень креатинина в биохимической лаборатории Государствен-

ного Медицинского Университета «Н.Тестимицану» (зав. лабораторией профессор В. Гудумак) Кишинева. Концентрацию TGF-β1 и AngII пересчитывали на ммоль креатинина (нг/ммоль креатинина). Все дети находились в клинико-лабораторной ремиссии. Контрольную группу составили здоровые дети (10 детей), без почечной патологии в анамнезе.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica for Windows 6.0. с определением χ<sup>2</sup> и корреляционного анализа. Достоверными считали различия показателей при p<0,05.

**Результаты и обсуждение**

Исзуемые группы больных не были статистически различимы по полу и возрасту.

Высокая частота острого пиелонефрита отмечалась у детей в возрасте до 3 лет (p>0,05), обострение пиелонефрита отмечалось у 62% больных с ПМР. При анализе спектра возбудителей в урокультуре было установлено преобладание E.coli – в 80,2% случаев, St. epidermidis – 2,8%, Enterococcae – 5,6%, Kl. pneumoniae – 8,6%, Pr.mirabilis – 2,8%, в 57,7% урокультура была стерильной (p<0,05). Умеренная лейкоцитурия (23,6±9,6) встречалась у большей половины пациентов с ПМР (p>0,05). Среди обследованных нами детей было отмечено преобладание тяжелой степени РН у 52,4% мальчиков (χ<sup>2</sup>=10,2, p<0,05).

Результаты УЗИ почек у 15 детей с ПМР (21,1%) показали уменьшение их размеров (χ<sup>2</sup>=13,36, p<0,05) и повышение эхогенности почечной паренхимы в 80,3% случаев (χ<sup>2</sup>=.171, p>0,05). У детей с III – IV степенью ПМР и тяжелой степенью РН, определялась нечеткость почечного контура в 20% случаев слева и в 10% справа (χ<sup>2</sup>=.18,63 p<0,001). При I-II степени ПМР и легкой степенью РН размеры почек были уменьшены справа в 13,3% случаев (p<0,05). У 10 пациентов с тяжелой степенью РН отмечалось повышение АД.

Из анализа цистографий выяснилось, что у 25 больных (35,2%) преобладает левосторонний ПМР, у 14 пациентов (19,7%) – правосторонний, в 45,1% случаев был диагностирован двусторонний ПМР. Гипотонический тип мочевого пузыря был установлен в основном у детей с ПМР и тяжелой степенью РН, гипертонический тип достоверно чаще при I-II степени РН (p <0,05).

При I-II степени ПМР тяжелая степень РН определялась в 28,6% случаев и в 71,4% случаев при III-IV степени ПМР (χ<sup>2</sup>=3,34, p>0,05) (рис.1).

Мочевая экскреция AngII и TGF-β1 в зависимости от

Таблица 1. Мочевая экскреция AngII и TGF-β у детей с ПМР и РН (нг/ммоль креатинина)

Показатели	AngII (нг/ммоль креатинина)				TGF-β1 (нг/ммоль креатинина)	
	n	%	M± m	P	M± m	P
1.ПМР I-II степени	32	45,1	73,56 ±9,2	p1,2>0,05 p1,7<0,05 p3,4>0,05 p3,5<0,001 p3,7<0,05 p4,5<0,05 p4,7<0,001 p5,7<0,001 p6,7<0,001	234,07 ±31,2	p1,2>0,05 p1,7<0,05 p2,7<0,05 p3,4>0,05 p3,5<0,001 p3,7>0,05 p4,5<0,001 p4,7>0,05 p5,7<0,001 p6,7<0,01
2.ПМР III-IV степени	39	54,9	83,96±10,02		226,91±38,14	
3.ПМР без РН	9	12,6	40,84 ±3,9		147,32±12,55	
4.РН (легкая) I-II степени	41	57,7	54,4 ±4,5		165,97±35,5	
5.РН (тяжелая) III-IV степени	21	29,6	143,15±13,8		381,182±28,2	
Гипостенурия	19	31,1	83,8 ±8,1		241,08±37,34	
Нормостенурия	42	68,8	76,7 ±10,6		202,2± 33	
СКФ < 90 мл/мин	34	47,9	80,43 ±9,51	256,83±27,8		
СКФ 90 мл/мин	37	52,1	77,4 ±9,44	186,63±22,1		
6.Вся группа	71	100	79,3±6,86	230,14±25,1		
7.Контрольная группа (здоровые дети)	10	100	28,44±2,7	107,51±24,35		

## ■ Оригинальные научные публикации

клинико-функциональных нарушений у детей с ПМР и РН представлены в таблице 1.

При изучении мочевой экскреции TGF- $\beta$ 1 была выявлена повышенная его концентрация в среднем в 2,1 раза у всех детей с ПМР по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). При этом у детей с тяжелой степенью РН отмечалась более выраженная экскреция TGF- $\beta$ 1 в моче при сравнении с контролем и группой детей с легкой степенью РН ( $381,18 \pm 28,2$ ,  $t = -7,34$ ,  $p < 0,001$ ). Средний уровень TGF- $\beta$ 1 в моче у пациентов с ПМР без РН был ниже, чем у больных с выраженными признаками тубулоинтерстициального повреждения ( $p > 0,05$ ), но достоверно выше, чем в контроле ( $147,32 \pm 12,55$ ,  $p < 0,05$ ).

Средний уровень AngII в моче у детей с I-II степенью ПМР, был повышен в 2,5 раза, а при III-IV степени в 2,9 раза по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ). Уровень AngII в моче при тяжелой степени РН был также достоверно выше ( $143,15 \pm 13,8$ ,  $t = -4,97$ ,  $p < 0,001$ ), чем в группе детей с легкой степенью РН и контрольной группой, что, по-видимому, свидетельствует о склерозировании тубулоинтерстициальной ткани и уменьшении нормально функционирующей паренхимы. Больные с ПМР без РН характеризовались умеренным увеличением уровня AngII в моче при сравнении с группой детей с РН I-II степенью ( $40,84 \pm 3,9$  и  $54,4 \pm 4,5$  соответственно,  $p > 0,05$ ), но существенно превышали показатели, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ).

Была изучена зависимость мочевой экскреции данных профиброгенных цитокинов от скорости клубочковой фильтрации и выраженностью РН. Оказалось, что среднее значение экскреции с мочой AngII и TGF- $\beta$ 1 у детей со сниженной скоростью клубочковой фильтрации ( $< 90$  мл/мин) было выше, чем у пациентов с умеренными изменениями тубулоинтерстициальной ткани и нормальной скоростью клубочковой фильтрации ( $p > 0,05$ ). Корреляционный анализ выявил положительные связи между повышенной экскрецией TGF- $\beta$ 1 и AngII в моче и тяжелой степенью РН ( $r_{xy} = 0,55$ ,  $p < 0,05$ ).

Известно, что возможным вариантом исхода уродинамических нарушений при ПМР является развитие нефросклероза, как без присоединения бактериального компонента, так и возникновением вторичного пиелонефрита. Наряду с этим возможно появление особой формы патологии-рефлюкс-нефропатии, которая возникает у 30-60% детей с ПМР [8,9]. При инфекции мочевых путей на фоне ПМР, бактериальная адгезия к клеткам нефротелия приводит к перегрузке и дисфункции мезангиальных клеток и канальцевого эпителия, что вызывает почечную ишемию, которая усугубляет нарушение почечного кровообращения. Гиперперфузия, следующая за ишемией, может повышать уровень токсичных кислородных радикалов и увеличить зону почечного поражения, за счет повышения продукции биологически активных веществ – цитокинов и факторов роста, таких как TGF- $\beta$ 1 и AngII [10,11,12].

Полученные нами результаты исследования указывают на существенное увеличение уровня профиброгенных цитокинов в моче у всех детей с ПМР. Повышенная экскреция TGF- $\beta$ 1 и AngII с мочой при тяжелой степени РН, по-видимому, может служить критерием выраженности склеротических процессов в тубулоинтерстициальной ткани и уменьшения нормально функционирующей почечной ткани. Наши данные согласуются с Sweeney B. [13], Tevull T.G. и соавт. [14], которые также определили взаимосвязь

между нарушением уродинамики и активностью TGF- $\beta$ 1 в крови [13,14].

Повышение уровня профиброгенных цитокинов у детей с ПМР без признаков РН по данным ДМСА-сцинтиграфии, можно объяснить тем, что у этой категории детей происходит усиленная инфильтрация почечного интерстиция макрофагами и лимфоцитами, значительная пролиферация фибробластов, что определяет это как пресклеротическую стадию развития рефлюкс-нефропатии. Поскольку проксимальные канальцы, поврежденные ишемией, являются основным источником факторов роста, значительное повышенное содержание TGF- $\beta$ 1 и AngII в моче по мере возрастания тяжести тубулоинтерстициального повреждения указывает на гиперпродукцию данных цитокинов и усиленную пролиферацию фибробластов с разрастанием соединительной ткани [15]. Схожие результаты были получены и Sabasinsca A. и соавт. (2008), обнаруживших высокую прямую корреляционную связь между мочевой экскрецией TGF- $\beta$ 1 у детей с ПМР, тяжестью самого рефлюкса и почечным повреждением [16]. Рядом авторов было отмечено наличие тесной взаимосвязи между уровнем TGF- $\beta$ 1 в моче и степенью тяжести повреждения почечной ткани у детей с ПМР, осложненным РН [17,18].

Суммируя полученные данные, можно предположить, что основной причиной, приводящей к развитию рефлюкс-нефропатии у больных детей с ПМР, является повышенная продукция факторов роста в условиях формирующейся РН. Установленная нами прямая корреляционная связь между уровнем экскреции TGF- $\beta$ 1 и AngII и степенью тяжести РН у больных с ПМР свидетельствует о целесообразности и перспективности их включения в качестве маркеров прогнозирования развития рефлюкс-нефропатии.

### Выводы

1. У всех больных с ПМР и РН отмечено повышение в моче уровня TGF- $\beta$ 1 и AngII, что позволит использовать данные изменения для ранней диагностики рефлюкс-нефропатии у детей с ПМР.

2. Повышенное содержание TGF- $\beta$ 1 и AngII в моче в группе пациентов без РН представляют собой как пресклеротическую стадию развития тубулоинтерстициального фиброза

3. Установленная положительная корреляционная связь между мочевой экскрецией AngII и TGF- $\beta$ 1, а также степенью тяжести тубулоинтерстициального повреждения у детей с ПМР может служить прогностическим критерием прогрессирования нефропатии

### Литература

1. Wheeler, DM, Vimalachandra D, Hodson EM, Smith GH, Craig JC. Interventions for primary vesicoureteric reflux (Cochrane Review). The Cochrane Database of Systematic Reviews 2004, Issue 3
2. De Heer, E., Sijpkens Y. W., Verkade M., den Dulk M. et al. Morphometry of interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15 Suppl 6:72 – 73
3. Зоркин, С. Н. Факторы риска развития повреждения почек у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом. *Вопросы соврем. педиатрии*. 2003; 2(1): 71 – 73
4. Ruiz-Ortego, M., Lorenzo O., Suzuki Y., Ruperes M. Proinflammatory actions of angiotensin II. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 2001; 10:321 – 329
5. Klabr, S., Morrissey J. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney Int.* 2000;57; suppl. 75:7 – 14.
6. Sandberg, K., Ji H. Kidney angiotensin receptors and their role in renal pathophysiology // *Semin. Nephrol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 402 – 416.
7. Goldraich, N., Ramos O., Goldraich I. Urography versus DMSA scan in children with vesicoureteral reflux. *Pediatr. Nephrol.*, 1984, vol.3, p.117 – 119.

8. Bundy, D. G., Serwint, J. R. Vesicoureteral Reflux. *Pediatr. Rev.* 2007; 28: 6 – 8

9. Moorthy, I. Easty M, McHugh K, Ridout D, Biassoni D., Gordon I. The presence of vesicoureteric reflux does not identify a population at risk for renal scarring following a first urinary tract infection *Archives of Disease in Childhood* 2005;90:733 – 736

10. Burne-Taney MJ, Yokota N, Rabb H. Persistent renal and extrarenal immune changes after severe ischemic injury. *Kidney Int.* 2005;67(3):1002-1009

11. Jutley RS, Youngson GG, Eremin O, Ninan GK. Serum cytokine profile in reflux nephropathy. *Pediatr Surg Int.* 2000;16(1-2):64 – 8.

12. Chertin, B., Rolle U, Cascio S, Upregulation of angiotensin II receptors in reflux nephropathy. *Pediatr Surg.* 2002 Feb;37(2):251 – 5.

13. Sweeney, B., Cascio S., Velayudham M., Pui P. Reflux nephropathy in infancy: a comparison of infants presenting with and without urinary tract infection. *J. Urol.* 2001; 166:2:648 – 650

## Оригинальные научные публикации

14. Tevull, T. G., Working P. K., Cbow C. P., Green J. D. Pathology of recombinant human Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in rats and rabbits. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1993;51:3590 – 3594

15. Carlton, M. Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development *Pediatric Nephrology*, Volume 22, Number 3 /, 2007, p.343 – 349

16. Sabasinsca, A., Zoch-Zwierz V, Wasilevsca A, Porowski T. Laminin and transforming growth factor beta-1 in children with vesicoureteric reflux. *Pediatr. Nephrol.* (2008) 23:769 – 774

17. Eddy, A. A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr. Nephrol.*, 2000, 15:290 – 301

18. Kobayashi, H; Miyakita H; Yamataka A; Koga H; Lane GJ; Miyano T. Serum basic fibroblast growth factor as a marker of reflux nephropathy. *J Pediatr Surg.* 2004; 39(12):1853 – 5

Поступила 11.01.2012 г.