На правах рукописи

ЗАЙКОВА

Наталья Михайловна

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ РЕФЛЮКС-НЕФРОПАТИИ У ДЕТЕЙ В ОБОСНОВАНИИ РАННЕЙ РЕНОПРОТЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ (КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.01.08 – Педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в обособленном структурном подразделении - «Научно-исследовательский институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:
Заслуженный врач РФ,
доктор медицинских наук, профессор **Длин Владимир Викторович**

Доктор медицинских наук **Гусева Наталья Борисовна**

Официальные оппоненты:
Доктор медицинских наук, профессор **Летифов Гаджи Муталибович**
профессор, заведующий кафедрой педиатрии и неонатологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерство здравоохранения Российской Федерации

Доктор медицинских наук, профессор **Зорин Игорь Владимирович**
профессор кафедры факультетской педиатрии, проректор по лечебной работе и региональному развитию здравоохранения федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерство здравоохранения Российской Федерации

Доктор медицинских наук, профессор **Кириллов Владимир Иванович**
профессор кафедры педиатрии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерство здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « »_____2021 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.072.18 при ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1) и на сайте www.rsmu.ru

Автореферат разослан «___» _____2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор **Дубровская Мария Игоревна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В последние годы отмечается нарастание частоты заболеваний органов мочевой системы в детской популяции, а рецидивирующее течение заболеваний почек приводит к инвалидизации детского и взрослого населения. Высокая стоимость лечения данных заболеваний на всех этапах патологического процесса определяет социальную значимость данной проблемы. У детей с инфекцией мочевой системы (ИМС) установлена высокая частота пузырно-мочеточникового рефлюкса (ПМР) – 15-64,5% (Stein R., 2015; Nordenström J., 2017; Fuentes S., 2017; Alberici I., 2019). ПМР является одной из наиболее распространенных врожденных уропатий у детей (Alberici I., 2019; Morozova O.L., 2020). Обратный ток мочи в мочеточник и затем в почку при микции повышает уровень давления в почечной лоханке и обусловливает повторяющееся повреждающее действие на уротелий, что приводит к персистенции интерстициального воспаления и почечному фиброзу (Nogueira A., 2017; Kostadinova E., 2018). По данным разных исследований, у детей с рецидивирующей ИМС на фоне ПМР развивается рефлюкс-нефропатия (РН) в 25–60% случаев (Hidas G., 2015; Capozza N.,2017; Морозова О.Л., 2018). Установлена частота РН по данным Международного комитета по изучению ПМР: 48% у европейских детей, 54% у латиноамериканских детей и почти у 60% детей в России (Лавренчук О.В., 2016). Основными признаками прогрессирования РН являются протеинурия, артериальная гипертензия, постепенное снижение функции почек, вплоть до развития терминальной хронической почечной недостаточности (тХПН), в связи с чем в 15-25% случаев требуется проведение диализа и трансплантации почки (Mills K.T., 2015; Calderon-Margalit R., 2018).

По данным регистра ERA-EDTA, ежегодное выявление новых случаев тХПН в Европе на 1 млн детей составляло 7,1 случая в 1980-1984 гг. и 9,9 случая в последующие 15 лет, 25 случаев – в 2015 г. и до 40 случаев – в 2019 г. (Kramer A., 2019). Сообщается, что более тяжелые стадии РН чаще диагностируются у мальчиков, чем у девочек с развитием тХПН (в соотношении 2:1) (Capozza N., 2017; Плешкова Е.М., 2018). Определены факторы, способствующие развитию и прогрессированию РН: высокая степень рефлюкса, двусторонний процесс (Hodson C.J., 1975), мужской пол, ранний возраст ребенка, сочетание рефлюкса с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря (Battelino N., 2016; Hodson E.M., 2016; Calderon-Margalit R., 2018; Renda R., 2018). Доказана роль мочевой инфекции в склерозировании почечной ткани (Lee S.J., 2015; Wolfe A., 2015; Karavanaki K.A., 2018; Alberici I., 2019). ПМР в сочетании с непрерывно рецидивирующей ИМС в 2 раза чаще приводит к тяжелому нефросклерозу, чем при длительной ремиссии ИМС (Shaikh N., 2016; Vachvanichsanong P., 2016; Korbel L., 2017; Okarska-Napierała M., 2017). В то же время Edwards A. и соавт. (2019) не подтвердили связь рефлюкса и инфекции

в развитии нефросклероза: развитие РН отмечалось в 28,5-44% случаев у детей со «стерильным» рефлюксом высокой степени.

Однако многие авторы до сих пор не могут ответить на поставленный вопрос: что же является пусковым механизмом в развитии РН – воздействие механического фактора (обструкция), или персистирование рецидивирующей инфекции, или же сочетание этих факторов (Просова Е.Е., 2018; Hidas G., 2015). Независимо от вида первичного поражения (иммунного или неиммунного воспаления) отмечаются гемодинамические изменения в интерстициальной ткани почек с вовлечением клубочкового аппарата и исходом в нефросклероз. Определено значение про- и противовоспалительных цитокинов как факторов почечного повреждения: интерлейкины (ИЛ) -6, -8, -10, профиброзирующие факторы, такие как трансформирующий фактор роста (TGF-β1), ингибирующий фактор миграции макрофагов, эндотелин 1-го типа и моноцитарный белок 1-го типа (Паунова С.С., 2014; Зорин И.В., 2017; Chevalier R.L., 2016; Parmaksiz G., 2016; Zhang W.R., 2018).

Ключевую роль в инициации тубулоинтерстициального фиброза отводят ангиотензину II (AngII). Являясь основным профиброгенным фактором, инициирующим и поддерживающим процессы фибриллогенеза, AngII стимулирует синтез TGF-β1, который усиливает пролиферацию клеток и образование соединительной ткани (Hussein A., 2015; Parmaksız G., 2016). В ответ на повреждение почечной ткани TGF-β1, действуя как мощный индуктор пролиферации фибробластов, стимулирует продукцию экстрацеллюлярных матричных белков (фибронектина, протеогликанов), активирует продукцию и накопление в интерстиции и в базальной мембране коллагенов I, III, IV типов (Bimpaki E., 2017; Kostadinova E., 2018). Кроме того, поврежденные клетки проксимальных канальцев могут сами продуцировать интерстициальный коллаген I и III типов (Nasiri S.J., 2015). Однако данные механизмы недостаточно изучены при ПМР и РН.

Патогенетическим средством защиты почки является фармакологическая блокада AngII и уменьшение внутриклубочковой гипертензии, которую можно достичь путем использования ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ) (Зорин И.В., 2017; Wzgarda A., 2017; Schmidt M., 2017). Однако возникают вопросы о сроках назначения иАПФ при ПМР и РН.

Таким образом, остаются недостаточно изученными факторы предрасположенности к развитию нефропатии при ПМР, патогенетические механизмы развития и прогрессирования этой патологии, а также последовательность включения данных механизмов, стадийность развития патологического процесса при РН. Понимание этих процессов является необходимым для научного обоснования ранней нефропротективной терапии и методов профилактики прогрессирования склеротических изменений в почках при ПМР и развития тяжелых осложнений.

Степень разработанности проблемы

На сегодняшний день большое внимание уделяется изучению осложнений ПМР и выбора метода консервативной или оперативной его коррекции, распространенности РН у детей с ПМР, изучению уровней микроальбуминурии, ИЛ как диагностических маркеров РН (Кириллов В.И., 2019; Kostadinova E., 2018; Zhang W.R., 2018). Многочисленными клиническими исследованиями установлено, что проблемы диагностики являются наиболее сложными в случае прогрессирующего течения РН, так как течение заболевания при этом нередко бессимптомное и часто приводит к развитию тХПН (KDIGO, 2013; Becknell B., 2015; Brophy P.D., 2015; Morozova O.L., 2020).

Остаются недостаточно изученными факторы прогрессирования РН и не разработаны способы, предупреждающие неблагоприятное течение тубулоинтерстициального процесса, развивающегося у детей с инфицированным и стерильным ПМР (Раздолькина Т.И., 2017; Bimpaki E., 2017; Cakici E.K., 2019).

Определение содержания известных маркеров РН в крови и моче, таких как ИЛ-6, -8, -10, молекула повреждения почек 1-го типа (kidney injury molecule 1, KIM-1), липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL), протеин, связывающий жирные кислоты печеночного типа (liver type fatty-acid binding protein, L-FABP) лишь констатируют наличие почечного повреждения, но не позволяют определять вектор лечебной тактики (Prasad M.M., 2017; Zhang W.R., 2018; Kostic D., 2019; Morozova O.L., 2020). Не выяснена диагностическая роль профиброгенных маркеров, в том числе AngII и TGF-β1, в определении характера течения и степени тяжести РН (Hussein A., 2015; Parmaksız G., 2016).

Не существует единого подхода к ранней диагностике повреждения паренхимы почек при ПМР, осложненном ИМС. С помощью статической нефросцинтиграфии можно выявить фиброзные очаги, которые уже сформировались, но не нельзя обнаружить начальные почечные изменения (Saleh Farghaly H.R., 2015; Shaikh N., 2016; Wongbencharat K., 2016; Balestracci A., 2019), к тому же не во всех регионах имеется возможность проведения статической нефросцинтиграфии.

Следовательно, существует необходимость в разработке чувствительных методов для ранней диагностики воспалительных и склеротических повреждений почечной ткани у детей с ПМР. Сообщается, что уровень прокальцитонина (ПКТ) в крови выше 0,5 нг/мл является диагностическим маркером почечного повреждения при ПМР и фебрильной инфекции (Julián-Jiménez A., 2015; Fadel F.I., 2016), не изучена его связь со склеротическими изменениями в почечной ткани (Лекманов А.У., 2015; Токарчук Н.И., 2015). В то же время недостаточно сведений о диагностическом значении определения ПКТ в моче (Meisner M., 2001).

Выявлена генетическая предрасположенность к развитию ПМР в рамках CAKUT. Маркерами предрасположенности к развитию РН могут быть определенные антигены HLA (human leukocyte antigens — человеческий лейкоцитарный антиген). Предыдущие исследования доказали, что HLA-гаплотипы являются маркерами изменений структуры гена, ответственного за развитие ПМР и почечного повреждения (Torres V., 1980).

В последнее время особое внимание уделяется изучению генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (Bhandari S., 2016; Lee K.H., 2017; Calderon-Margalit R., 2018), но до настоящего времени не изучалась связь генотипов гена *ACE* с прогрессированием РН.

Раннее назначение иАПФ при РН остается предметом дискуссии. Большинство исследователей рекомендуют терапию иАПФ при развитии артериальной гипертензии (АГ) и явной протеинурии (Абдуллаев К.И., 2016). Некоторыми авторами обсуждается вопрос о назначении иАПФ при прогрессировании тубулоинтерстициального фиброза до развития явной АГ (Паунова С.С., 2014; Зорин И.В., 2017).

Проведены экспериментальные работы по изучению морфологических изменений в почках при инфицировании ПМР (Летифов Г.М., 2015; Bowen S.E., 2013; Fillion M.L., 2014; Yuksel O.H., 2018). В эксперименте на крысах Singal A. и соавт. (2005) определена динамика склеротических изменений в почечной ткани после антибактериальной терапии (в течение 2 суток) и 6-ти недельного курса применения иАПФ. Описания результатов более длительного применения иАПФ в эксперименте при ПМР и их влияния на предупреждение прогрессирования нефросклероза, а также на мочевые уровни профиброгенных маркеров и маркеров коллагенообразования в доступных экспериментальных работах нами не найдено.

Таким образом, несмотря на высокую частоту развития нефросклероза и тХПН у детей с ПМР, остаются нерешенными следующие вопросы: факторы риска и маркеры прогрессирующего течения РН, генетические аспекты прогрессирования РН, влияние коррекции ПМР на предупреждение развития и прогрессирования РН, ограничения методов диагностики почечного повреждения у детей младшей группы с ПМР. Следовательно, определение основных закономерностей формирования и, прогрессирования тубулоинтерстициального процесса при ПМР у детей позволит предложить диагностический алгоритм определения тяжести РН и обосновать раннюю ренопротективную терапию. Это послужило основанием для формулирования цели исследования.

Цель исследования

Установить закономерности формирования и прогрессирования рефлюкс-нефропатии на основе клинических и экспериментальных данных для разработки системы прогнозирования течения заболевания и обоснования ренопротективной терапии.

Задачи исследования

1. Определить клинико-функциональные и допплерографические особенности прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей.
2. Выявить основные факторы риска, маркеры тяжести рефлюкс-нефропатии, роль полиморфизмов генов *ACE* у детей в прогрессировании склеротических изменений в почечной ткани.
3. Изучить морфологические особенности формирования и прогрессирования поражения почек, диагностическое значение маркеров склерозирования почечной ткани, определить эффективность раннего назначения нефропротективной терапии в эксперименте с моделированием нефросклероза.
4. Обосновать раннее назначение нефропротективной терапии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом для предупреждения формирования и прогрессирования рефлюкс-нефропатии.
5. Разработать модель индивидуального прогнозирования прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей.
6. Разработать алгоритмы формирования, тяжести и прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом.

Научная новизна

Сформулирована патогенетически обоснованная концепция прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом, определяемая преимущественным влиянием высоких степеней пузырно-мочеточникового рефлюкса, ассоциированных с аллельным полиформизмом гена *ACE* и рецидивирующей инфекцией мочевой системы.

Впервые в нефрологии предложен метод ранней диагностики почечного повреждения у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом, позволяющий сформировать тактику лечения, предупреждающую прогрессирование рефлюкс-нефропатии (защищен патентом РФ).

Впервые в нефрологии с использованием подходов доказательной медицины выделены новые информативные маркеры развития и прогрессирующего течения рефлюкс-нефропатии, на основании которых разработано уравнение индивидуального прогноза.

Получены новые данные, свидетельствующие о высоком диагностическом значении определения мочевых уровней профиброгенных факторов, β2-микроглобулина, прокальцитонина и свободного оксипролина, которые коррелируют с тяжестью почечного поражения у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом.

Установлена связь между тяжестью рефлюкс-нефропатии и полимофизмом генов *ACE* у пациентов с пузырно-мочеточниковым рефлюксом. Доказано, что для детей с генотипом D/D

гена *ACE* характерно формирование тяжелых форм рефлюкс-нефропатии и развитие более тяжелых стадий заболевания.

Определены морфологические этапы формирования и прогрессирования нефросклероза у крыс в зависимости от экспериментальной модели. Доказано, что раннее назначение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента снижает выраженность тубулоинтерстициального фиброза и уровни ангиотензина II, β2-микроглобулина и свободного оксипролина в моче у крыс.

Ренопротективная терапия ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента эффективна независимо от стадии рефлюкс-нефропатии, и позволяет предупредить дальнейшее прогрессирование тубулоинтерстициального процесса у большинства детей.

Научно обоснованы алгоритмы развития и прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом, позволяющие на ранних этапах заболевания формировать группы детей с высоким риском развития и прогрессирования склеротических процессов в почечной ткани.

Практическая и теоретическая значимость

Доказано, что определение полиморфизма гена *ACE* у пациентов с ПМР позволяет выделить больных с высоким риском прогрессирования РН.

Предложен метод ранней диагностики почечного повреждения у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом, позволяющий сформировать тактику лечения, предупреждающую прогрессирование рефлюкс-нефропатии, защищен патентом РФ. Характер нарушений функционального состояния почек и внутрипочечной гемодинамики у детей с ПМР и РН может быть использован в определении тяжести и прогнозирования течения почечного повреждения при длительном наблюдении за больными с ПМР.

Экспериментально доказана эффективность раннего назначения иАПФ, заключающаяся в менее выраженном развитии нефросклероза, сопровождающемся более низким уровнем профиброгенных факторов и свободного оксипролина в моче у крыс.

Детям с ПМР предложено раннее назначение иАПФ до развития у них протеинурии и выраженных признаков нефросклероза по данным ДМСА-сцинтиграфии с целью предупреждения прогрессирования РН. Предложены алгоритмы ранней диагностики и прогрессирования РН у детей.

Методология и методы исследования

Проведено проспективное нерандомизированное исследование 318 детей с ПМР. Диссертационное исследование одобрено Локальным Этическим комитетом Публичного медико-санитарного учреждения «Институт матери и ребенка» (г. Кишинев, Республика

Молдова), протокол № 2 от 15.09.2015, и обособленного структурного подразделения «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева» ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, протокол № 2 от 28.02.2020.

Родители/опекуны детей, включенных в исследование, а также дети, достигшие 14-летнего возраста, предоставили письменные информированные согласия. Исследование проведено с соблюдением этических норм в соответствии с Хельсинской декларацией. Для изучения клинико-диагностических особенностей РН и эффективности нефропротективной терапии применяли комплекс клинико-анамнестических, антропометрических, лабораторно-инструментальных и статистических методов исследования. Для определения основных этапов развития нефросклероза проведена экспериментальная работа на 45 крысах. Экспериментальная работа проводилась согласно Международным рекомендациям по проведению биомедицинских исследований с использованием животных (Washington D.C., 1996).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Установлена зависимость развития РН от степени ПМР у детей: чем выше степень ПМР, тем чаще формируется нефросклероз. С помощью регрессионной модели показано, что единственным статистически значимым фактором инициации развития рефлюкс-нефропатии рефлюкс-нефропатии является ПМР. Динамику течения склеротического процесса определяет снижение кровотока.
2. Повышение уровня профиброгенных маркеров, показателей коллагенообразования, прокальцитонина, наличие различных генотипов гена *ACE* прогнозируют развитие и прогрессирование рефлюкс-нефропатии у детей. Генотип D/D гена *ACE* является независимым предиктором тяжести поражения почек у детей с ПМР.
3. Уровень прокальцитонина выше 4,8 нг/ммоль Cr в моче является критерием прогрессирующего течения рефлюкс-нефропатии у детей.
4. Определены морфологические различия раннего и позднего этапов развития тубулоинтерстициального фиброза при инфицированном и неинфицированном ПМР в эксперименте. Прогрессирование нефросклероза зависит от инфицирования мочевых путей и длительности нарушения уродинамики. Критериями эффективности ранней нефропротективной терапии являются менее выраженное развитие нефросклероза, низкий уровень профиброгенных маркеров и свободного оксипролина в моче у крыс.
5. Раннее назначение иАПФ детям с ПМР предупреждает прогрессирование фибропластических процессов в почечной ткани и снижает в моче уровни маркеров коллагенообразования и профиброгенных маркеров при РН.

6. Частое рецидивирование ренальной инфекции и генотип D/D гена *ACE* являются ведущими факторами риска прогрессирования РН. У детей с ПМР предложен алгоритм определения тяжести течения РН.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует формуле специальности 14.01.08 – Педиатрия. Медицинские науки – и областям исследования пунктам № 3 – физиология и патология детей периода новорожденности, раннего, дошкольного и школьного возраста; № 6 – внутренние болезни у детей.

Личный вклад

Автор является ответственным исполнителем научно-исследовательских тем, в рамках которых выполнено данное исследование. Автор лично определил цель и задачи исследования, разработал план и методологические подходы к их выполнению, осуществил сбор материала, сбор анамнеза, осмотр и курацию больных, лично выполнил экспериментальную часть исследования, забор мочи и подготовку образцов к специальному биохимическому исследованию. Автором лично проведены статистическая обработка материалов исследования, анализ полученных результатов, подготовка и публикация статей по теме диссертации.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности результатов подтверждается представленными исходными данными, достаточным числом наблюдений, использованием общепринятых методов исследования, а также современными методами статистической обработки полученного материала.

Основные положения диссертационного исследования доложены и обсуждены на Конгрессах European Society for Pediatric Nephrology: Будапешт, Венгрия, 2007; г. Бирмингем, Великобритания, 2009; г. Дубровник, Хорватия, 2011; г. Краков, Польша, 2012; г. Порту, Португалия, 2014; г. Брюссель, Бельгия, 2015; г. Глазго, Великобритания, 2017; г. Анталия, Турция, 2018; на Конгрессах International Pediatric Nephrology: г. Шанхай, Китай, 2013; г. Фос-ду-Игуасу, Бразилия, 2016; г. Венеция, Италия, 2019; на Конгрессах Европейской почечной ассоциации диализа и трансплантации — ERA-EDTA: Мадрид, Испания, 2017; Будапешт, Венгрия, 2019; Милан, Италия, 2020; на Конгрессах детских нефрологов стран СНГ: г. Минск, Белоруссия 2013, г. Киев, Украина 2016, г. Минск Белоруссия 2017; на Конгрессах «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (г. Москва, 2010, 2012, 2013, 2014, 2017, 2018, 2019); на Конгрессах педиатров-нефрологов России: г. Санкт-Петербург, 2003; г. Воронеж, 2005; г. Ростов-на-Дону, 2012; на Национальном Конгрессе «Здоровые дети – будущее страны»: г. Санкт-Петербург (2017, 2018, 2019); на Российском конгрессе «Педиатрия и детская хирургия» в

Приволжском федеральном округе (г. Казань 2017, 2018, 2019); на международной конференции Pediatric Surgery International Conference «Performances and Perspectives in the Pediatric Surgery Development» (г. Кишинев, Молдова 2017).

Работа отмечена поощрительными грантами 39-го Конгресса (Будапешт, Венгрия, 2007) European Society for Pediatric Nephrology и 16-го Конгресса (г. Шанхай, Китай, 2013) International Pediatric Nephrology Association.

Внедрение результатов исследования

Научные положения и практические рекомендации исследования внедрены в клиническую практику нефрологического и урологического отделений ГБУЗ города Москвы «Детская городская клиническая больница №9 им. Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы» (главный врач д.м.н., профессор А.А. Корсунский), отделения нефрологии ОСП - «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева» (и.о. директора д.м.н, профессор В.В. Длин) ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, в лекционный курс программ повышения квалификации «Педиатрия» на кафедре педиатрии и детских инфекционных болезней Клинического института детского здоровья им. Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Публикации по теме диссертации

По материалам сследования опубликовано 58 работ, в том числе 17 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК для опубликования основных научных результатов диссертации, 19 статей в других рецензируемых журналах.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 449 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 8 глав собственных результатов исследования, заключения с обсуждением результатов, выводов и практических рекомендаций. Работа содержит 56 таблиц и 180 рисунков, 2 схемы. Библиографический указатель включает 391 источник, их них 91 отечественных и 300 зарубежных авторов.

ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа состоит из 2 частей: клинической и экспериментальной. Клиническое исследование больных проводилось на базе отделения нефрологии и урологии ПМСУ «Институт матери и ребенка», (г. Кишинёв, Молдова) в период 2007-2012 гг.

Критериями включения были пациенты с верифицированным ПМР без нейрогенной дисфункции мочевого пузыря, осложненным инфекцией мочевой системы, в возрасте от 1 до 16 лет, которым была проведена статическая нефросцинтиграфия для определения степени и тяжести рефлюкс-нефропатии, которые составили основную группу; наличие информированного согласия пациентов и/или их законных представителей. Структура больных с ПМР представлена на рисунке 1.

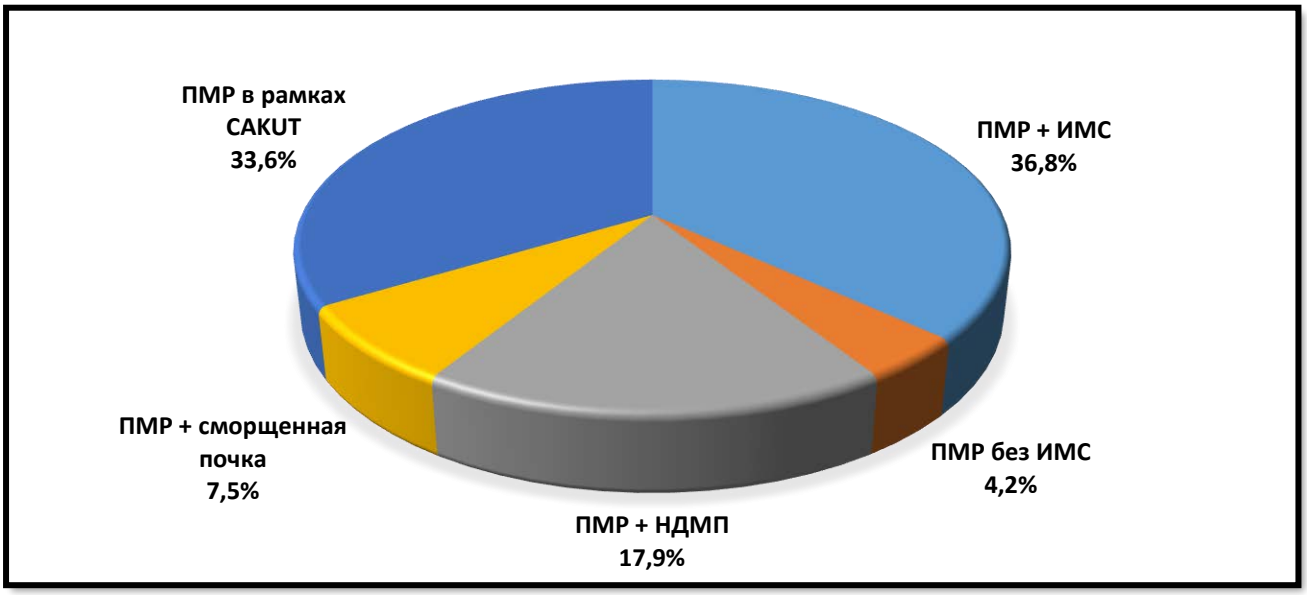


Рисунок 1 – Структура распределения детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом (n=318), % госпитализированных в отделение нефрологии и урологии ПМСУ «Институт матери и ребенка» за период 2007–2012 гг.

Критерии не включения были: вторично-сморщенная почка, хроническая почечная недостаточность, ПМР в рамках CAKUT, артериальная гипертензия, отказ пациентов и/или родителей от обследования.

Основную группу составили 117 детей с ПМР. По данным ДМСА-сцинтиграфии, у 99 (84,6%) детей с ПМР диагностирована РН различной степени тяжести, у 18 (15,4%) больных с ПМР не выявлено признаков РН. В группе детей с нефросклерозом чаще наблюдался D тип РН (33%), в 11,9% случаев регистрировался А тип РН. У мальчиков (54,3%) чаще, чем у девочек (17,1%) регистрировался D тип РН ($p=0,0001$), в группе больных без РН половых различий не установлено ($p>0,05$).

Группу контроля составили 40 здоровых детей, не имеющих патологии почек (в анамнезе и при включении в исследование), находящиеся на обследовании в отделении реабилитации, в

связи с патологией нервной системы или скелета, которым проводилось аналогичное исследование, сравнимых по возрасту (6,24±0,31 года) и полу – 24 (60%) девочки (рисунок 2).

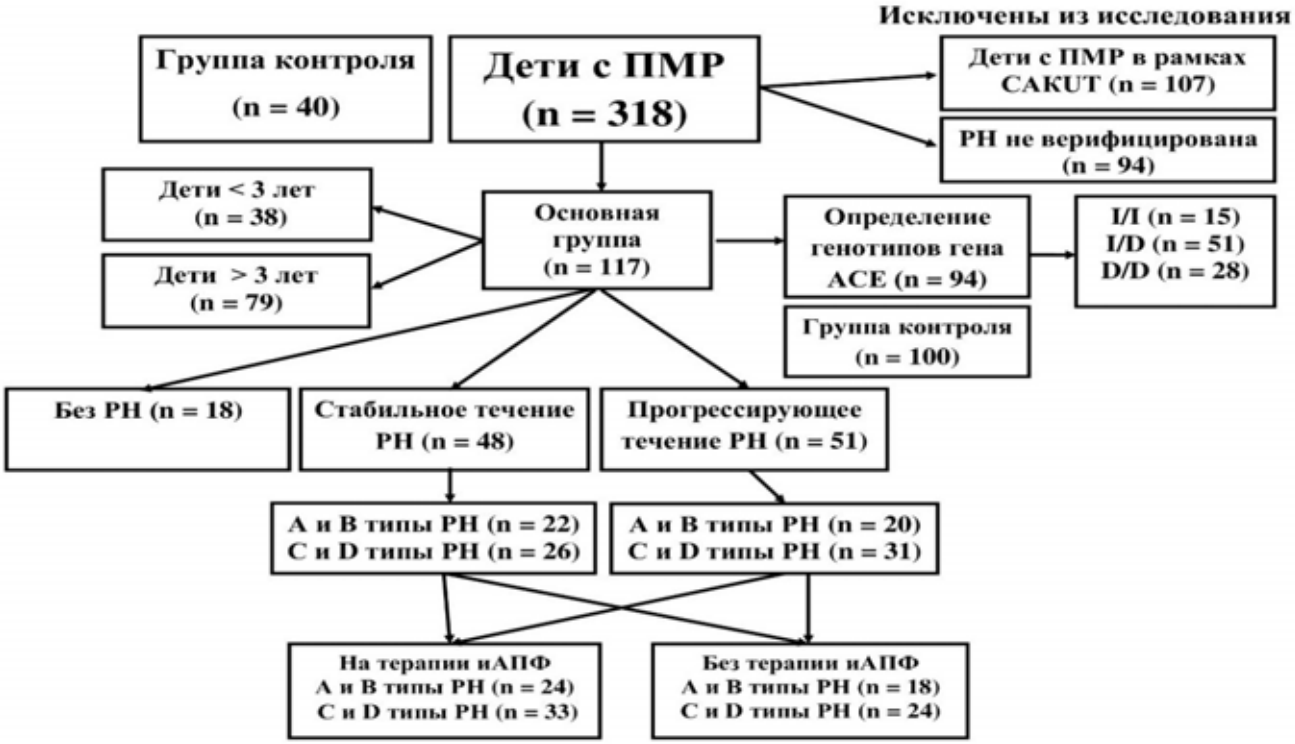


Рисунок 2 - Формирование групп исследования

В зависимости от поставленных задач пациенты с ПМР были разделены на группы и подгруппы:

Группа сравнения (1 группа) – больные с различной степенью ПМР без РН (n= 18, средний возраст 2,7±0,6 лет), 12 девочек (66.7%); 2 группа – больные с легким течением РН включала детей с А и Втипами РН по данным статической нефросцинтиграфии (n= 42, средний возраст 5,8±0,5 лет), 26 девочек (61.9%); 3 группа – больные с тяжелым течением РН включала детей с С и D типами РН по данным статической нефросцинтиграфии (n= 57, средний возраст 5,4±0,5 лет), 44 девочки (77.2%).

Все пациенты с РН были распределены на подгруппы в зависимости от течения РН: прогрессирующее (появление новых очагов склероза в динамике наблюдения) и не прогрессирующее (отсутствие новых очагов склероза в динамике наблюдения).

Таким образом, в зависимости от характера течения РН в каждой группе были выделены подгруппы: 2А (n=22, средний возраст 5,3±0,2 лет), 14 девочек (63,6%) и 3А (n=26, средний возраст 6,17±0,55 лет), 19 девочек (73,1%) – без прогрессирования РН (стабильное течение); 2Б

(n=20, средний возраст 6,4±0,8 лет), 12 девочек (60%) и 3Б (n=31, средний возраст 4,65±0,45 лет), 25 девочек (80,6%) – с прогрессированием РН.

Обследование носило комплексный характер и включало клинико-анамнестические, инструментальные и лабораторные исследования, которые включали в себя общеклинические и специальные методы обследования. Всем пациентам проведено: микционная цистография, экскреторная урография, ультразвуковое исследование ОМС и ультразвуковая допплерография сосудов почки, расчет скорости клубочковой фильтрации по формуле Шварца. Стадии ХБП классифицировали в соответствии с рекомендациями K/DOQI (2002) по СКФ. Для выявления РН и определения ее типа всем детям с ПМР проведена статическая нефросцинтиграфия с ДМСА (димеркаптосукциновая кислота). Стадии рефлюкс-нефропатии определялись согласно классификации Piepsz A. и соавт. (2001): Тип А – 1-2 рубца, Тип В – 2-3 рубца с сохранной почечной паренхимой, Тип С – очагово-диффузное распространение склеротических очагов с сохраненным почечным контуром, Тип D – «маленькая» или атрофированная почка.

Молекулярно-генетическое исследование полиморфизма гена *ACE* проведено по методике Tiret L. и соавт. (1992) в лаборатории молекулярной генетики человека (руководитель лаборатории к.м.н. Секарэ В.И.) Центра Матери и Ребенка (г. Кишинев, Молдова). В качестве популяционного контроля для сравнения распределения генотипов и аллелей гена *ACE* использовали выборку из 100 здоровых детей (не имеющих патологии почек), представителей коренной этнической группы в возрасте 11±5 (6; 16) лет. Все участники исследования или их ближайшие родственники подписывали информационное согласие, подтверждающее их добровольное участие в исследовании.

Специальные методы включали в себя: исследование мочевого уровня профиброгенных маркеров, показателей коллагенообразования, уровня ферментов мочи, уровней микроальбумина и β-2 микроглобулина, уровня прокальцитонина в утренней моче в стадии ремиссии инфекции мочевой системы (медиана ремиссии составила 2 [1; 3] мес). Для исследования использовалось 10 мл мочи. Уровни изучаемых маркеров пересчитывали на ммоль креатинина, определенного в конкретной порции мочи.

Уровни ангиотензина II (АнгII), трансформирующего фактора роста (TGF-β1) определяли на биохимическом анализаторе «Униплан» (США) методом иммуноферментного анализа ELISA с использованием наборов фирмы «Human TGF-beta-1 Quantikine ELISA Kit» и «Human Angiotensin II Quantikine ELISA Kit» (Великобритания).

Определение экскреции микроальбумина (МАУ) с мочой проводилось иммуноферментным методом анализа на биохимическом анализаторе «Униплан» (США) на приборе «HemoCue Albumin 201». Уровень β2-микроглобулина (β2-МГ) определяли методом

иммуноферментного анализа ELISA набором «Tina-quant a beta 2-microglobulin» (фирма Boehring Mannhaim), «Randox» (Великобритания), на приборе «IMMULITE 2000 XPi».

Определение активности псевдохолинэстеразы (ПХЭ) в моче проводилось на основе катализа гидролиза субстрата I-бутирилтиоколина с образованием бутировой кислоты и тиоколина на спектроколориметре «Spekol 221», с использованием набора «Elitec», (Франция). Тиоколин при взаимодействии с кислотой 5,5-дитио-би-(2-нитро-бензоат) образует 2-нитромеркаптобензоат – золотисто-желтый комплекс. Активность фермента прямо пропорциональна увеличению количества 2-нитромеркаптобензоата в щелочной среде.

Определение активности нейтральной α-1-глюкозидазы (α-1-ГЛ) проводили по методике, описанной Асатиани В.С. (1969). Принцип метода основан на ферментативном гидролизе синтетического субстрата – п-нитрофенил-α-D-глюкопиранозида с выделением паранитрофенола, количество которого коррелирует с активностью фермента (набор «EPISCREEN PLUS»).

Уровни свободного (СВО) и пептид-связанного оксипролина (ПСО) определяли по методу П.Н. Шараева (1996). Метод основан на оценке плотности красного хромогена, получаемого в результате окисления и декарбоксилирования молекулы оксипролина и конденсации продукта окисления с парадиметиламинобензальдегидом, на приборе «Behrotest®».

ПКТ изучали в утренней моче иммунохроматографическим тестом (метод Brachms PCT-Q). Набор реагентов представляет собой пластиковую планшету прямоугольной формы, содержащую иммунохроматографическую экспресс-тест-полоску для просмотра результатов анализа с тестовой и контрольной линиями. К набору прилагается наклейка в историю болезни со сравнительной шкалой.

Экспериментальная часть работы. Для воспроизведения модели нефросклероза в исследование было включено 75 инбредных крыс WKY (Wistar-Kyoto) одного возраста весом 240±40 гр. (вес от 200 гр. до 280 гр.). На первом этапе у 20 крыс была проведена обструкция уретры (перевязка уретры с помощью кетгута) и введение в полость мочевого пузыря (надлобковой пункцией) 0,1 мл *E.coli*, полученной из мочи ребенка с острым пиелонефритом (Khalil A., 1997). На 3-5 день появились гнойные очаги на коже, отказ от еды и повышение температуры, отсутствие мочи. Все они погибли на 5-6 день. У 10 крыс было выполнено прямое ведение 0.1 мл *E.coli* в паренхиму почки хирургическим путем (Singal A.K., 2005), все они погибли в первые два дня после открытого хирургического вмешательства. При вскрытии особей гнойные очаги были обнаружены во всех органах и тканях. Во второй этап эксперимента было включено 45 крыс. Для воспроизведения модели нефросклероза мы провели эксперимент по методике Haraoka M. и соавт. (1994). Максимальная длительность наблюдения составила 6 месяцев. Соответственно поставленной цели для выполнения экспериментального исследования

подопытные особи были разделены на 3 модели: модель 1 (n=9) группа 1 – моделирование стеноза уретры; модель 2 (n=9) группа 2 – инфицирование мочевых путей, лечение антибиотиком (цефотаксим) в течение 5 дней); модель 3 (n=24) группа 3 – моделирование стеноза уретры и инфицирование мочевых путей. Дизайн экспериментальной части работы представлен на рисунке 3.

Рисунок 3 – Дизайн экспериментальной части работы.

В зависимости от терапевтического воздействия модель 3 была распределена на 2 подгруппы: 3А подгруппа (n=9) – лечение антибиотиком (цефотаксим 40 мг/кг) в течение 5 дней; 3Б подгруппа (n=15) – лечение антибиотиком (цефотаксим 40 мг/кг) в течение 5 дней и иАПФ (эналаприл 0,1 мг/кг) в течение всего периода эксперимента (1, 3 и 6 месяцев). Отдельно выделена группа контроля – 4 группа (n=3). Цистографию проводили на 1, 3 и 6 месяцах эксперимента, путем введения 0,3-0,5 мл урографина в полость мочевого пузыря с помощью инсулинового шприца перед декапитацией животных (рисунок 4). Выводили животных из эксперимента на 1, 3 и 6 месяцах наблюдения путем декапитации под ингаляционным наркозом парами эфира. Адекватное обезболивание исключало развитие болевого шока. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями по работе с лабораторными животными после одобрения Локальным этическим комитетом Государственного медицинского университета (г. Кишинев, Молдова). Морфологические исследования проводились методом макро- и микроскопии почечно-мочеточниковых комплексов, полученных от особей экспериментальных групп и группы контроля. Материалом для гистопатологического исследования послужили

биоптаты (1х1х0,5 см) почечно-мочеточникового комплекса, полученные при вскрытии животных, предварительно фиксированные в 4% и 10% растворе формалина в течение не более 12 часов. Обработка материала проводилась на базе ЦПАО ОМСУ Центра Матери и Ребенка (зав. отделением патоморфологии к.м.н. Петрович В.Г.). Гистопатологическая обработка материала в биоптатах проводилась согласно стаандартным протоколам гистологической технологии с использованием рутинных (гематоксилин-эозином – Г-Е) и специальных (пикрофуксином по Ван-Гизону – ВГ, анилиновым синим по Масону) методов окраски для идентификации степени развития соединительной ткани и коллагенообразования (рисунок 5 А, Б).

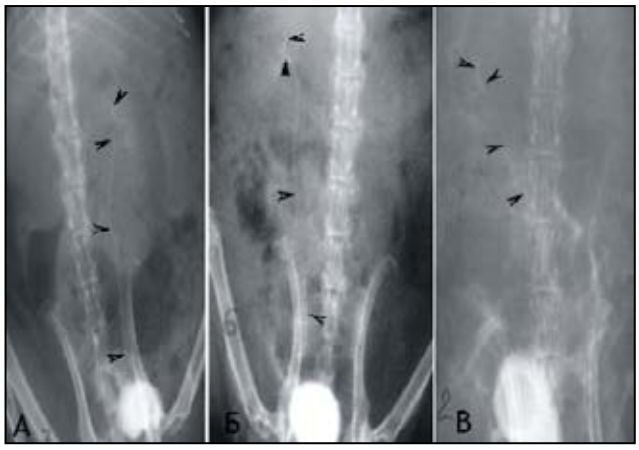


Рисунок 4 - Цистография у крыс. Пузырно-мочеточниковый рефлюкс III степени на 6 месяце эксперимента: А) слева у особи 1-й модели;
Б) справа у особи 2-й модели;
В) справа у особи 3 модели

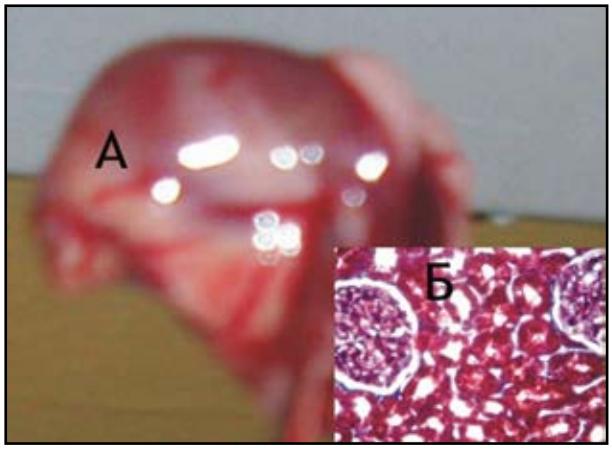


Рисунок 5 - Макро- и микроскопический образцы почки крысы из контрольной группы на 6 месяце А) макропрепарат почки; Б) гистопрепарат кортикальной зоны паренхимы почки в норме ×*200. Окраска анилиновым синим по Масону*

На 1, 3 и 6 месяцах эксперимента в моче животных определяли уровни: TGF-β1, AngII, микроальбумина, β2-микроглобулина, псевдохолинэстеразы и нейтральной α-1-глюкозидазы, а также свободного и пептид-связанного оксипролина. Исследования проводились в биохимической лаборатории (зав. лабораторией профессор В. Гудумак) Государственного медицинского университета «Н. Тестимицану» (г. Кишинев, Молдова). Уровни изучаемых маркеров пересчитывали на ммоль креатинина, определенного в конкретной порции мочи.

В работе использованы различные методы описательной и аналитической статистики. В описательной части данные приводились в виде абсолютных величин, процентов, долей, а также в виде мер центральной тенденции – среднего, медианы и моды. Вариативность данных была описана с помощью стандартного отклонения при нормальном распределении данных и

межквартильного интервала (нижний квартиль – 25% перцентиль; верхний квартиль – 75% перцентиль), когда распределение данных не соответствовало нормальному.

В аналитической части были использованы следующие статистические критерии: Хи-квадрат, точный критерий Фишера, t-критерий Стьюдента (несмотря на малый объем выборки применялся критерий Стьюдента, поскольку характер распределения данных существенно не отличался от нормального), критерий Вилкоксона и Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился по методам Спирмена и Пирсона. Для одновременного проведения проверки двух и более статистических гипотез – при сравнении двух независимых групп более, чем по двум показателям или в случае сравнения трех и более независимых групп – применялись однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) при распределении данных, близких к нормальному, и непараметрический критерий Краскела-Уоллиса при распределении, существенно отличавшемся от нормального. Если проведенный анализ выявлял достоверные различия между группами (p<0,05), то проводилось апостериорное тестирование, включавшее попарное сравнение групп с использованием t-критерия для несвязанных выборок и критерий Манна-Уитни (при наличии и отсутствии нормального распределения соответственно) с поправками на множественные сравнения Бонферрони, Тьюки, метод Холма, Бенджамини-Хохберга. Дисперсионный анализ проводился индивидуально по каждому изучаемому маркеру, достигаемые при этом уровни значимости корректировались процедурой Беньямини – Йекутили. Установление относительной важности предикторов осуществлялось с использованием пакета Boruta программно-статистической среды R и метода Random Forest. Также с этой целью использовалась порядковая и логистическая множественная регрессия. Индекс Джини использован для сравнения распределения признаков в разных группах и позволяет отслеживать динамику неравномерности распределения признаков. Для прогнозирования результатов лечения применялся ROC-анализ. Пороговый уровень значимости на всех этапах исследования принимался равным p=0,05. Степень корреляции до 0,3 была классифицирована как слабая, от 0,3 до 0,7 – средняя, более 0,7 – сильная. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 13 (производитель – Statsoft Inc.) и среды статистических расчетов R (www.cran.r-project.org) согласно рекомендациям по проведению медицинской статистики (сайт www.statsoft.ru). При планировании и проведении исследования следовали принципам GCP. Для статистического анализа экспериментальной части были взяты следующие морфологические изменения: клеточная инфильтрация, интерстициальный отек, интерстициальный фиброз. Для анализа морфологических данных была применена оценочная бальная шкала, описанная Rodrigues-Iturbe B. et al. (2005), где 0 – без изменений, 1 – слабые, 2 – умеренные и 3 – выраженные изменения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структура и частота рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом

По данным проведенного сравнительного анализа 318 детей с ПМР было установлено, что более чем треть случаев составляли дети с IV степенью ПМР; при I и II степенях ПМР одностороннее поражение встречалось чаще двустороннего ($p<0,05$) и, наоборот, двустороннее поражение чаще регистрировалось при III и IV степенях ПМР ($p<0,05$). В группе детей с ПМР превалировали девочки (78,3%), в то же время среди мальчиков чаще выявлялись тяжелые степени ПМР (IV степень – 52,2%, $p=0,029$), что согласуется с данными литературы (Tullus K., 2015; Korbel L., 2017); высокая степень ПМР регистрировалась чаще у детей младшего возраста (1-3 года); у детей старшего возраста чаще встречались низкие степени ПМР. У детей в возрасте до 3 лет дебют заболевания в 70,7% случаев начинался с манифестации инфекции мочевой системы; выраженная лейкоцитурия в 59,5% случаев выявлялась при IV степени ПМР; умеренная степень в 47,2% случаев регистрировалась у больных со II степенью ПМР; часто рецидивирующее течение ИМС характерно для больных с III и IV степенями ПМР (в 23,8% и 30,2% случаев, соответственно). По данным УЗИ и УЗДГ почек у больных с IV степенью ПМР пиелоэктазия зафиксирована у 94,8% пациенов, гиперэхогенность паренхимы в 82,8% случаев; снижение IR на уровне междолевых и междольковых артерий (в 55,2%) и обеднение кровотока у в 22,5% случаев, соответственно. У большинства пациентов с ПМР преобладала ХБП I стадии (94,6%), II (в 7,7%) и III (в 1,7%) стадии ХБП наблюдались при IV степени ПМР. Основным осложнением ПМР является развитие РН, которая по данным литературы, встречается у 30-60% детей с ПМР [Hidas, G., 2015; Capozza, N., 2017].

Распределение больных с ПМР с/без РН по полу к моменту первого обследования представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение больных по тяжести РН в зависимости от пола (n=117), n (%)

Типы РН/пол	Мальчики n=35 (29,9%)	Девочки n=82 (70,1%)
1.Нет РН n=18 (15,4%)	5 (14,3%)	13 (15,9%)
2. А тип n=20 (17,1%)	2 (5,7%)	18 (21,95%)
3. В тип n=18 (15,4%)	4 (11,4%)	14 (17,1%)
4. С тип n=28 (23,9%)	5 (14,3%)	23 (28,1%)
5. D тип n=33 (28,2%)	19 (54,3%)*	14 (17,1%)*

*Примечание: Для анализа данных использовался точный критерий Фишера. В группе мальчиков: p1–5=0,0009, p2–5=0,0001, p3–5=0,0003, p4–5=0,0009; *p=0,0001.*

Среди обследованных 117 детей с ПМР, которым была проведена статическая нефросцинтиграфия с ДМСА, не установлено различий по половому признаку в зависимости от наличия и отсутствия РН (p>0,05). Однако, у мальчиков (54,3%) чаще, чем у девочек (17,1%) регистрировался D тип РН (p=0,0001). Мочевая инфекция играет большую роль в склерозировании почечной ткани (Karavanaki, K.A, 2017; Wang, H.H., 2019). Маркеры воспалительного процесса ОМС у детей с и без РН статистически не отличались. Так, лихорадка встречалась у 87,8% детей с РН и у 66,7% детей без РН (p>0,05), в клиническом анализе крови ускоренное СОЭ более 25 мм/час (по Панченко) отмечалось в 85,8% с РН и в 83,3% без РН случаев (p>0,05), нейтрофильный лейкоцитоз выявлен как у детей с РН, так и без признаков РН (67,7% и 55,6%, p=0,36).

При включении в исследование у детей без РН выраженная лейкоцитурия выявлена у 61,1% и у 72,7% детей с РН (p>0,05), микропротеинурия чаще отмечалась у детей основной группы (с признаками нефросклероза) по сравнению с детьми без РН (53,5% и 16,7%, соответственно, p<0,05). При анализе функционального состояния почек у больных с ПМР установлена зависимость СКФ и концентрационной функции почек от тяжести РН: чем тяжелее РН, тем чаще выявляются снижение СКФ и концентрационной функции почек (p<0,05).

Особенности прогрессирующего течения рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом

В соответствии с поставленными задачами было изучено влияние степени тяжести ПМР, а также частоты рецидивов ИМС на течение РН. В зависимости от течения РН выделены следующие группы и подгруппы: 1-я группа – дети без РН, 2А – со стабильным течением РН (тип А и В), 2Б – прогрессирующее течение РН (тип А и В), 3А – со стабильным течением РН (тип С и D), 3Б – с прогрессирующим течением РН (типы С и D).

Доказано, что в подгруппах с прогрессирующим течением РН (2Б и 3Б подгруппы) значимо чаще выявлялись высокие степени ПМР, чем в группе детей без РН (группа сравнения) и у пациентов со стабильным течением РН (2А и 3А подгруппы), где чаще диагностировались низкие степени ПМР (p<0,05), что подтверждается умеренной положительной корреляционной связью между степенью ПМР и стадией РН (r=0.43, p=0,03). У больных дошкольного возраста чаще выявлялись С и D типы и прогрессирующее течение РН, что подтверждается отрицательной корреляционной связью между возрастом больных и прогрессирующим течением РН (r= -0.41, p=0,015).

Установлена зависимость почечной гемодинамики от течения и тяжести РН: при прогрессирующем течении РН отмечалось снижение скорости кровотока и снижение

показателей сопротивления на междолевых артериях, что подтверждается выявленной отрицательной корреляционной связью между IR и тяжестью РН (r= -0,66, p<0,05).

Показатели IR на уровне междолевых артерий у пациентов в зависимости от тяжести и течения РН представлены на рисунке 6.

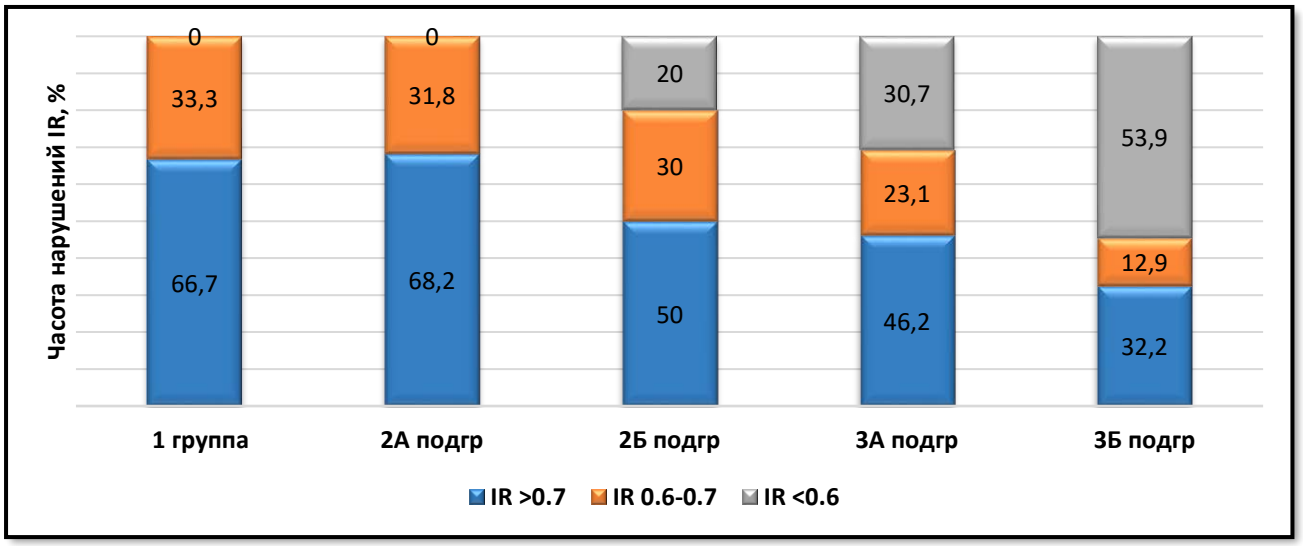


Рисунок 6 – Частота нарушений показателей индекса резистентности (IR) на уровне междолевых артерий у пациентов в зависимости от тяжести и течения рефлюкс-нефропатии (n=117), %.

В группе со стабильным течением РН скоростные характеристики были в пределах нормальных значений. Снижение скоростных характеристик у больных с С и D типами и прогрессирующим течением РН (3Б подгруппа), свидетельствует о значительной ишемии тубулоинтерстициальной ткани и отражает степень склероза, что подтверждается ранее проведенными исследованиями (Зорин И.В, 2014; Garcia-Roig M., 2016; Arlen A.M., 2016). Повышенные показатели IR на междолевых артериях у пациентов с А и В типами РН являются компенсаторной реакцией, снижающей внутриклубочковую гипертензию и, тем самым, предотвращает повреждение клубочков (Зорин И.В., 2014; Stein R., 2015).

Функциональные параметры почек также различались в зависимости от течения и тяжести РН. Установлена связь частоты нарушений СКФ от степени выраженности РН: если при А и В типах РН у большинства детей отсутствовало снижение СКФ или оно было минимальным, то у большинства больных с С и D типами РН, и, в основном, у больных с прогрессирующим течением РН отмечалось снижение СКФ (OR – 38,12, RR – 6,34). Повышенный уровень альбумина в моче чаще встречался при прогрессирующем течении РН. Выявление повышенного уровня МАУ у детей с А и В типами РН может служить ранним диагностическим признаком прогрессирующего течения нефросклероза.

Установлены средней силы положительные корреляционные связи между тяжестью РН, с одной стороны, и уровнем альбумина в моче (r=0,63, p<0,05), с высокой степенью ПМР (r=0,43, p<0,05), со сниженным кровотоком на междолевых артериях (r=0,67, p<0,05), со сниженными показателями сопротивления на междолевых артериях (r=0,66, p<0,05), с часто рецидивирующим течением ИМС (r=0,48, p<0,05), с другой, а так же средней силы отрицательная корреляционная связь со сниженной СКФ (r=-0,56, p<0,05). Выявленные корреляционные связи подтверждают значение высоких степеней ПМР и частых рецидивов ИМС в прогрессировании РН, а высокая альбуминурия, снижение показателей сопротивления на междолевых артериях, снижение СКФ – отражают степень повреждения нефрона.

Клиническое значение определения маркеров повреждения почечной ткани в моче у детей с рефлюкс-нефропатией

Для проведенного сравнительного анализа трех и более групп применялся критерий Краскера-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения Бонферрони и Тьюки.

При исследовании профиброгенных маркеров, показателей коллагенообразования, ферментов и микроальбумина, β-2 микроглобулина, ПКТ в моче не выявило значимых различий в зависимости от пола и возраста. Повышенный уровень AngII и TGF-β1 в моче наблюдался в подгруппах с РН (2Б, 3А и 3Б) по сравнению с группой детей без структурно-функциональных нарушений в паренхиме почек (p<0,05). Установлено, что у детей с С и D типами РН по сравнению с больными с А и В типами РН отмечалась более выраженная экскреция (в 5 раз) AngII и (в 2,5 раза) TGF-β1 (p<0,001) с мочой, что, вероятно, связано с более выраженными склеротическими изменениями тубулоинтерстициальной ткани почек у этой категории больных. Через год наблюдения установлено повышение уровня изучаемых маркеров в моче во всех изучаемых подгруппах, особенно при С и D типах РН, как при стабильном, так и при прогрессирующем течении РН (в 3А и 3Б подгруппах), что значимо выше, чем в группе сравнения (p<0,05).

Выявлена повышенная экскреция профиброгенных маркеров с мочой у детей со сниженной концентрационной функцией почек и низкой СКФ. Высокий уровень AngII и TGF-β1 в моче значимо чаще выявлялся у детей с низкими резистивными показателями сопротивления на уровне междолевых артерий; чем при нормальных показателях IR.

Следовательно, повышенный уровень экскреции AngII связан с формированием склеротических процессов в почечной ткани у детей с ПМР. Прогрессирующее течение РН ассоциируется со сниженным СКФ и со сниженной концентрационной функцией почек, сниженными показателями периферического сопротивления и высоким мочевым уровнем AngII

и TGF-β1, выступающих в роли патогенетических маркеров формирования нефросклероза. Медиана мочевых уровней AngII и TGF-β1 у больных с РН и без РН представлена на рисунке 7.

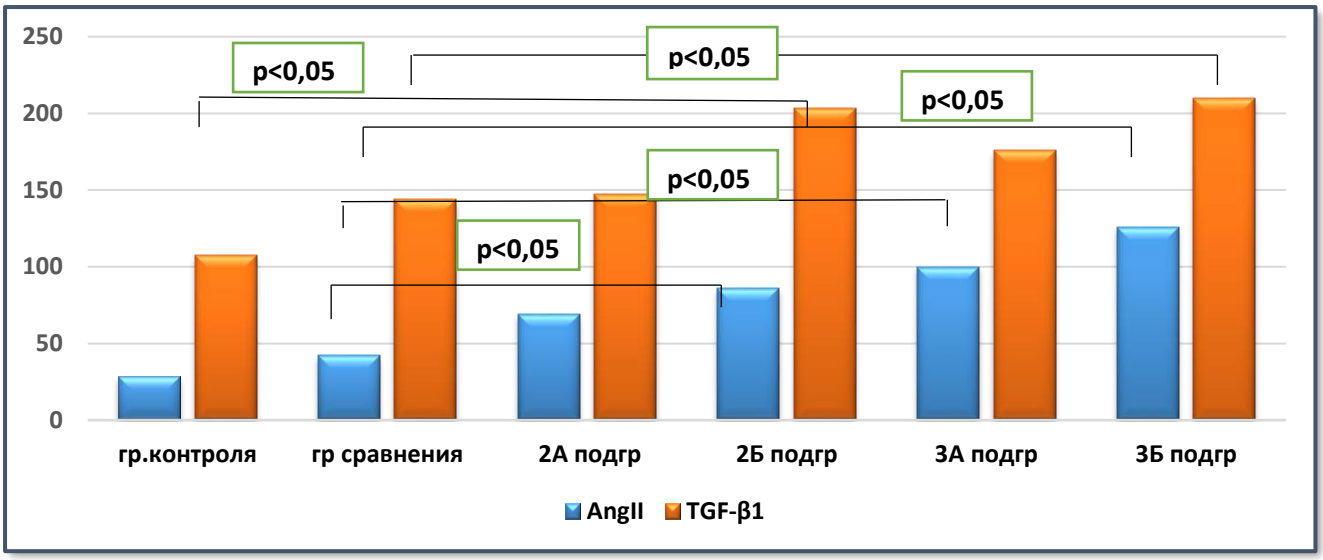


Рисунок 7 - Медиана уровней AngII и TGF-β1 в группе сравнения и в основных подгруппах при включении в исследование (n=117), нг/ммоль Cr.

Примечание: статистическая значимость, $p<0,05$

Связь между повреждением гломерулярной мембраны и повышенным уровнем ПХЭ в моче установлена в исследованиях Длина В.В. (1990), Ciuntu A.A. (2017). В нашем исследовании редко выявлялись признаки повреждения ГБМ: не установлено значимого повышения ПХЭ в моче как в группе сравнения, так и в подгруппах с А и В типами (2А и 2Б) РН ($p>0,05$); в подгруппах с С и D типами РН (3А и 3Б) отмечалась тенденция к его повышению без статистически значимого увеличения показателя ($p>0,05$). В динамике наблюдения также не отмечено значимого увеличения уровня ПХЭ в моче как при стабильном, так и при прогрессирующем течении РН. Следовательно, при РН вовлечение ГБМ происходит редко.

Определение активности α-1-ГЛ в моче имеет существенное диагностическое значение для выявления поражения почек, в частности, повреждения извитых канальцев (Sorokman T., 2018). Выявлены принципиальные отличия в мочевом уровне α-1-ГЛ при различном характере течения РН. Установлено, что активность α-1-ГЛ в моче была повышена у детей при С и D типах РН (в 3А и 3Б подгруппах) по сравнению с группой без РН ($p<0,05$). В динамике наблюдения мочевая активность α-1-ГЛ повысилась во всех исследуемых подгруппах, особенно у больных с С и D типами РН (в 3А и 3Б подгруппах, $p<0,05$), что свидетельствует о тяжести тубулоинтерстициального повреждения и подтверждается установленной положительной корреляционной умеренной связью ($r=0.415$, $p<0,01$) между активностью α-1-ГЛ в моче и

тяжестью РН. Повышенная мочевая активность α-1-ГЛ, выявленная у трети детей без структурно-функциональных нарушений в почечной паренхиме исходно и в динамике наблюдения, может являться ранним маркером тубулярного повреждения у детей с ПМР еще до развития признаков нефросклероза по данным нефросцинтиграфии с ДМСА, что и обосновывает необходимость определения его активности в моче при выявлении ПМР. Доказано, что у детей с прогрессирующим течением РН характерен повышенный уровень α-1-ГЛ в моче (чувствительность – 75,5% и специфичность – 76,9%, RR 1.01-1.25, p=0.024; OR – 1.01-1,25, *p*=0.029), что позволяет его использовать в качестве дополнительного неинвазивного критерия прогрессирования нефропатии, а для ПХЭ чувствительность и специфичность были низкими и составили 49,4% и 69,2%, соответственно.

Установлено значимое повышение МАУ и β2-МГ в моче у детей с РН по сравнению с группой больных с ПМР, но без РН и с контрольной группой ($p<0,05$). Для С и D типов РН характерны высокие мочевые уровни МАУ и β2-МГ, что подтверждается установленной положительной корреляционной связью между тяжестью РН, с одной стороны, и уровнями β2-МГ (r=0,506, $p<0,01$) и МАУ (r=0,414, $p<0,01$) в моче, с другой, что согласуется с данными других исследователей (Gerber C., 2016; Inker L.A., 2016; Mian A.N., 2017). Установлено, что часто рецидивирующее течение ренальной инфекции является неблагоприятным фактором, способствующим прогрессированию структурно-функциональных нарушений в ткани почек у детей с ПМР, и проявляется повышенным уровнем β2-МГ и МАУ в моче, что согласуется с данными других авторов (Zhao Y.F., 2016; Musiał K., 2018). Влияние частого рецидивирования ренальной инфекции на уровни МАУ и β2-МГ в моче обусловлено поражением дистальных канальцев, что может быть расценено как признак прогрессирования тубулоинтерстициального поражения, подтверждаемого установленной положительной корреляционной связью между уровнями МАУ и β2-МГ в моче у детей с РН (r=0.655, $p<0,01$). Увеличение уровня β2-МГ в моче у детей с ПМР без структурно-функциональных нарушений в тубулоинтерстициальной ткани почек объясняется повреждением проксимальных канальцев уже на начальных стадиях РН, проявляющимся снижением реабсорбции β2-МГ в проксимальных канальцах и увеличением его экскреция с мочой, что согласуется с данными Argyropoulos Ch.P. (2017).

Доказано, что у всех детей с РН имеется нарушение динамического равновесия между распадом и биосинтезом коллагена в сторону относительного превалирования процессов его распада в виде усиления выделения свободной фракции оксипролина с мочой, особенно при тяжелых стадиях заболевания и является показателем интенсивности данного процесса при туболоинтерстициальном склерозе, что согласуется с данными литературы (Шараев П.Н, 1997). Установлена высокая экскреция СВО у больных с РН как при стабильном, так и при

прогрессирующем течении РН по сравнению с больными без признаков РН (p<0,05). Мочевые уровни ПСО и СВО представлены на рисунке 8.

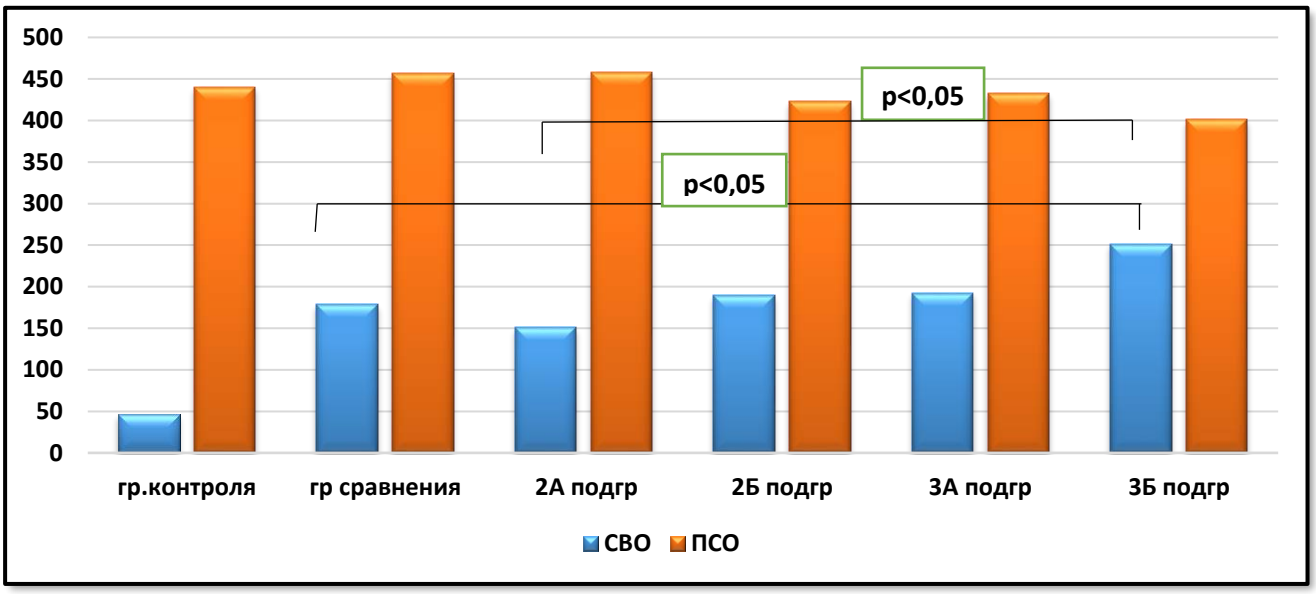


Рисунок 8 - Медиана мочевых уровней ПСО и СВО в группе сравнения и в основных подгруппах при включении в исследование (n=117), нг/ммоль Cr.

Примечание: статистическая значимость, p<0,05.

Через 12 месяцев наблюдения, частота больных с повышенным мочевым уровнем СВО увеличилась во всех подгруппах, но больше у больных с прогрессирующим течением РН (2Б и 3Б подгруппы). Повышенный уровень СВО у части больных без структурных изменений свидетельствует о том, что у этих пациентов имелись мелкие очаги склероза в паренхиме почек, которые подвергаются усиленному лизису, что и приводит к выявлению повышенного уровня СВО в моче, которые пока еще не выявляются на ДМСА-сцинтиграфии почек.

У детей с прогрессирующим течением РН (2Б и 3Б подгруппы) редко отмечалось повышение уровня ПСО в моче по сравнению с больными со стабильным течением РН (2А и 3А подгруппы, p<0,05), что свидетельствует об активном синтезе коллагена у больных с С и D типами РН. Установлена зависимость мочевой экскреции ПКТ от стадии РН. Так, в группе детей без признаков РН уровень ПКТ был значимо ниже, чем в группах детей с А, В, С и D типами РН (p<0,01). Повышенный уровень ПКТ в моче значимо чаще встречался у детей с прогрессирующим течением РН, чем в группе сравнения (p<0,05), что подтверждается установленной положительной корреляционной связью между уровнем ПКТ в моче и тяжестью РН (r=0.502, p<0,01). Не установлено разницы в уровне ПКТ в моче у детей в зависимости от

возраста: уровень ПКТ в моче у детей до 3 лет и старше 3 лет был сопоставим, что позволило нам предложить алгоритм определения течения рефлюкс-нефропатии (прогрессирующего или стабильного).

Уровень ПКТ в моче у детей с частыми рецидивами ИМС был значимо выше при сравнении с детьми, у которых рецидивов не было (p<0,05), что подтверждается установленной положительной корреляционной связью между уровнем ПКТ в моче с частотой рецидивирования ИМС у детей с ПМР и РН (r=0.452, p<0,01). Медиана уровня ПКТ в моче в зависимости от частоты рецидивов ИМС представлена на рисунке 9.

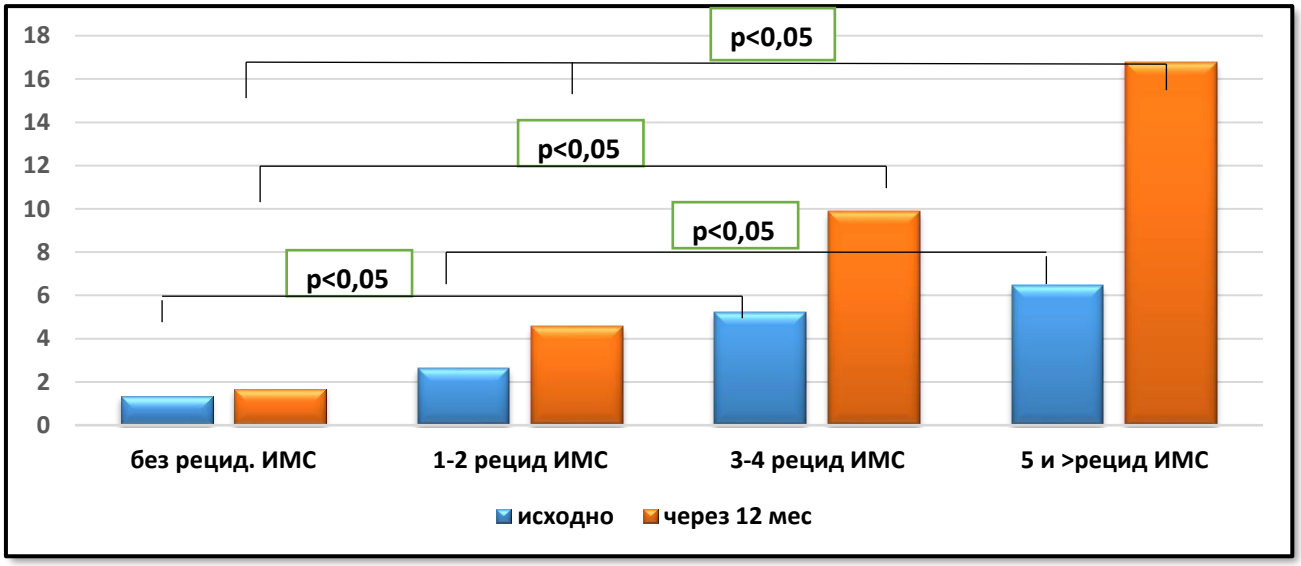


Рисунок 9 - Медиана уровня ПКТ/Cr в моче в зависимости от частоты рецидивов ИМС при включении в исследование и в динамике наблюдения (n=117), нг/ммоль Cr.
Примечание: статистическая значимость, p<0,05.

Уровень профиброгенных маркеров в моче был значимо выше у детей с частыми рецидивами ИМС. При отсутствии рецидивирования ИМС экскреция TGF-β1 и AngII с мочой не увеличивалась в динамике наблюдения, хотя была выше, чем у здоровых детей (p<0,05).

Таким образом, частое рецидивирование ИМС сопровождается развитием склеротических процессов в почечной ткани, что отражается высоким уровнем профиброгенных маркеров (TGF-β1 и AngII) в моче. Учитывая, что ПКТ является провоспалительным медиатором повреждения эндотелиальных клеток и предиктором инфекционного поражения почечной паренхимы, его уровень повышается в крови и, затем в моче, что дает основание считать, что мочевой уровень ПКТ отражает степень воспалительного процесса в тубулоинтерстициальной ткани почек.

Значимость высокого уровня исследуемых показателей в качестве диагностических признаков тяжести РН представлена ROC кривой изменения пороговых значений исследуемых

показателей AngII и TGF-β1 в моче: при высоком уровне AngII в моче отмечалась высокая вероятность выявления прогрессирующего течения РН (специфичность – 92,3%, чувствительность – 77,6%); чувствительность и специфичность TGF-β1 оказалась ниже – 69,4% и 76,9% соответственно, но достаточной в оценке тяжести течения РН, что является дополнительным значимым критерием прогрессирования РН (рисунок 10).

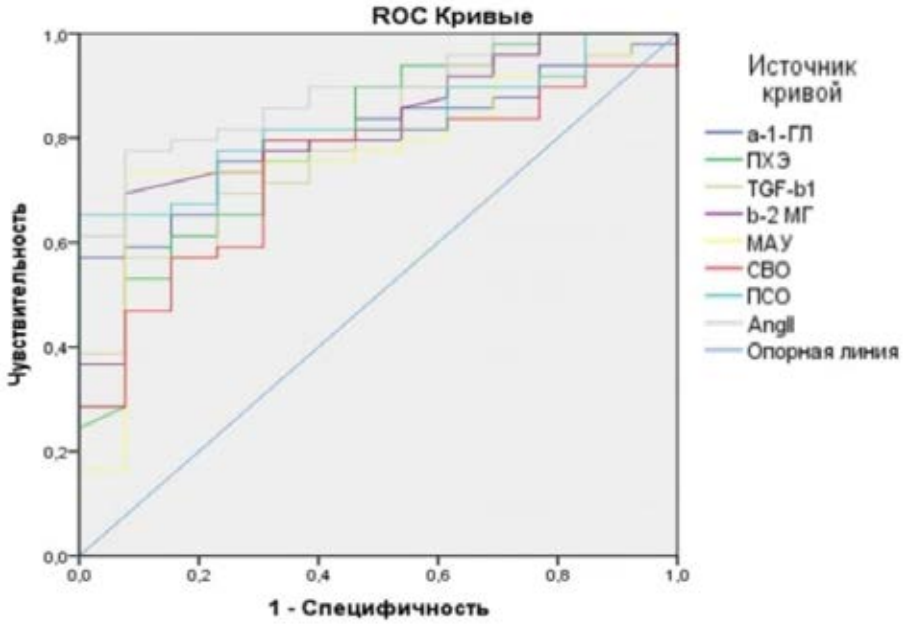


Рисунок 10 - Предиктивная значимость изучаемых маркеров в вероятности выявления прогрессирующего течения РН.

Проведен кластерный анализ (метод к-средних, который позволил рассмотреть основные группы маркеров, разделённых на кластеры, способные инициировать и прогнозировать течение РН. У больных с ПМР без признаков склероза по данным статической нефросцинтиграфии с ДМСА отмечается сочетание незначительного повышения AngII и TGF-β1 со свободной фракцией оксипролина в моче, что расценено как пресклеротическая стадия нефропатии. Признаки дисфункции эпителия канальцев в виде повышения α -1-ГЛ и β2-МГ в моче были умеренными.

У детей с легкой стадией (А и В типами) и стабильным течением РН выявлено умеренное повышение профиброгенных маркеров (AngII и TGF-β1), повышенный уровень маркеров коллагенообразования – как СВО, так и ПСО, что свидетельствует об активности процессов склерозирования. Признаки тубулярной дисфункции были более выраженными во 2Б подгруппе:

установлено повышение β2-МГ, α-1-ГЛ, МАУ, а также, в части случаев, повреждение гломерулярного фильтра в виде повышения уровня ПХЭ в моче.

У детей со стабильным течением и тяжелыми стадиями (С и D типами) РН (3А подгруппа) выявлено значимое увеличение AngII и TGF-β1. показателей коллагенообразования и тубулярной дисфункции: β2-МГ, α-1-ГЛ, МАУ; в подгруппе больных с прогрессирующим течением РН (3Б подгруппа) был выявлен самый высокий уровень профиброгенных маркеров в моче; отмечалась выраженная тубулярная дисфункция в виде высоких мочевых уровней α -1-ГЛ, МАУ и β2-МГ. Наблюдалось уменьшение нормально функционирующей почечной ткани со снижением концентрационной функции почек и снижением СКФ, с повышенным лизисом соединительной ткани в виде высокого уровня СВО и низкого уровня ПСО в моче.

При помощи кластерного анализа (методами многомерного шкалирования, конструирования дендрограмм и *k*-средних) установлено, что AngII, TGF-β1, СВО, α-1-ГЛ и МАУ являются маркерами прогрессирования тубулоинтерстициального поражения почек.

Анализ ассоциаций полиморфизма гена *ACE* с развитием и прогрессированием рефлюкс-нефропатии у детей с ПМР

Нами изучены ассоциации полиморфных вариантов гена *ACE* при ПМР. Распределение генотипов I/I, I/D и D/D гена *ACE* среди больных с ПМР и в группе контроля соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (p>0,05).

Установлено, что в группе детей с генотипом I/D, большинство составляли девочки (84,3%, p=0,0001), при генотипе D/D – мальчики и девочки встречались с одинаковой частотой (p=0.42). Установлена зависимость тяжести ПМР от генотипов гена *ACE*: в группе детей с генотипом I/I значимо чаще выявлялась I степень ПМР (p=0,014) при сравнении с генотипом D/D; в группе детей с генотипом D/D наиболее часто определялась IV степень ПМР по сравнению с генотипом I/I (p=0,02). Установлено, что генотип I/I гена значимо чаще встречался у детей без РН и с А и В типами аРН; у детей с генотипом D/D значимо чаще встречались больные с С и D типами РН (в 4 раза чаще, чем у детей с генотипом I/I, p<0,05). На рисунке 11 представлено распределение генотипов гена *ACE* в зависимости от типов РН.

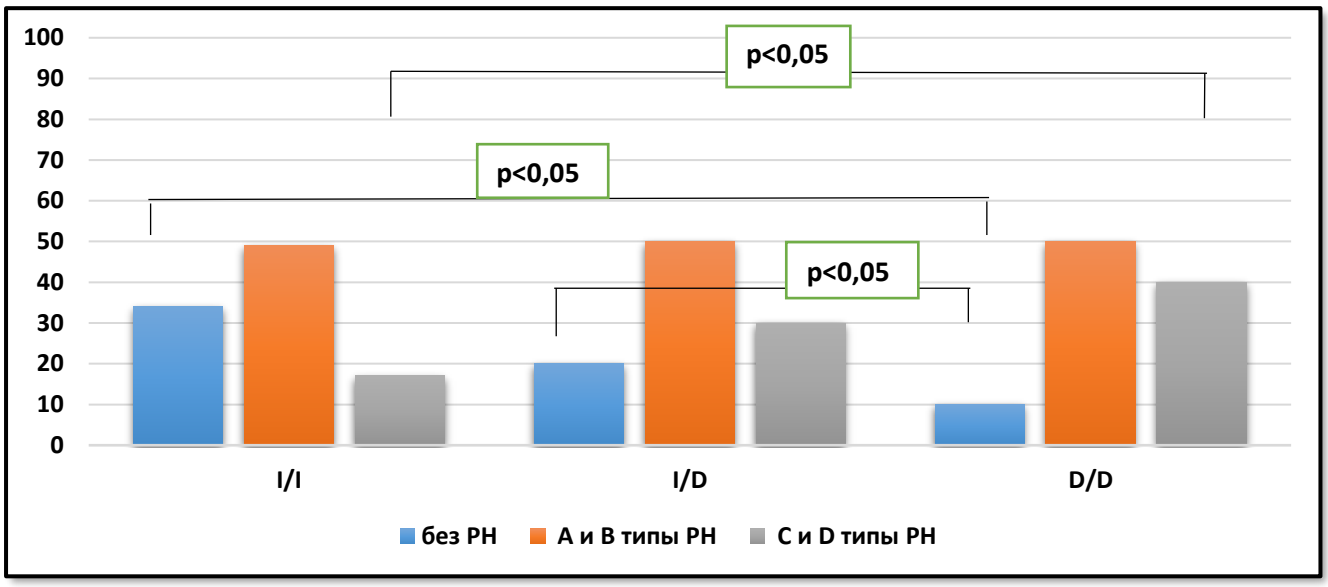


Рисунок 11 - Распределение полиморфных вариантов гена *ACE* в зависимости от типов РН

Примечание: статистическая значимость, p<0,05

Установлено, что нарушение тубулярных функций почек имело место у 2/3 детей с генотипом D/D, у трети – с генотипом I/D (p=0.006) и не выявлено у детей с генотипом I/I гена *ACE*. СКФ менее 90 мл/мин/1,73м^2 характерно для детей с генотипом D/D (70%) и редко при генотипе I/I гена *ACE* (около 5%) (рис. 12).

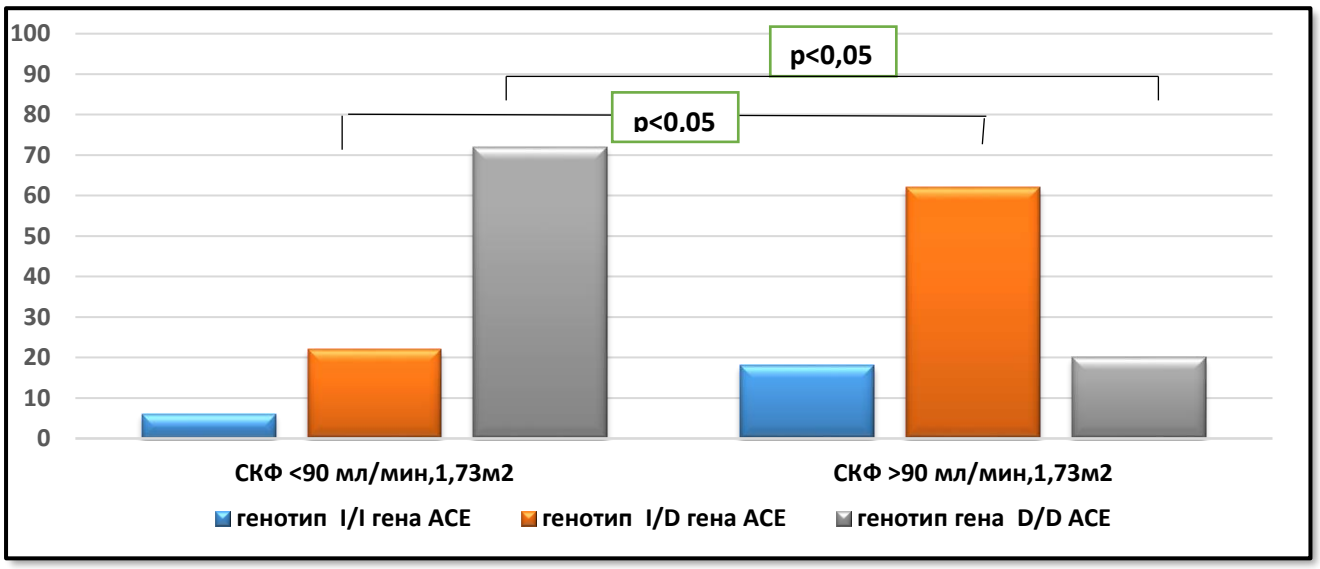


Рисунок 12 - Распределение полиморфных вариантов гена *ACE* в зависимости от СКФ

Примечание: статистическая значимость при сравнении в группах, p<0,05

Выявлено, что у детей с генотипом D/D медиана значений AngII была значительно выше, чем у пациентов с генотипом I/I (p=0,002). Медиана значений TGF-β1 в группе детей с генотипом D/D была в 1,6 раза выше, чем у детей с генотипом I/D (p=0,047) и в 2,4 раза выше, чем у пациентов с генотипом I/I (p=0,023) Установлена положительная корреляционная связь между AngII и TGF-β1 у детей с генотипом D/D (r=0.547, p=0,001 и r=0.306, p=0,009, соответственно), что подтверждает связь генотипа D/D с профиброгенными факторами, а значит и с развитием тубулоинтерстициального склероза. Медиана значений изучаемых маркеров представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Медиана значений [25;75 перцентиль] профиброгенных маркеров и ферментов, показателей коллагенообразования, уровня ПКТ в моче у детей обследованных групп в зависимости от генотипов гена *ACE*

Показатели	Генотипы гена *ACE*			p
	Генотип I/I	Генотип I/D	Генотип D/D	
Ангиотензин II (нг/ммоль Cr)	41,72* [21,81;51,88]	64,365 [37,01;105,705]	85,43* [63,045;130,49]	**0,002**
Трансформирующий фактор роста β1 (нг/ммоль Cr)	117,406* [67,991;165,899]	173,471 ** [106,688;291,219]	278,018* (**) [132,231;365,369]	***0,023** ****0,047**
Псевдохолинэстераза (МЕ/ммоль Cr)	6,639* [5,529;10,971]	14,813* [6,216;38,15]	10,901 [7,454;29,469]	0,079
α-1 нейтральная глюкозидаза (МЕ/ммоль Cr)	6,322* [5,438;10,325]	11,542 [5,56;28,507]	18,447* [6,98;47,925]	**0,046**
β2 микроглобулин (нг/ммоль Cr)	11,383* [2,272;19,489]	13,308 [4,768;26,536]	27,319* [7,539;49,591]	**0,004**
Микроальбумин (мг/ммоль Cr)	13,86* [6,197;22,098]	17,278 [8,9;29,717]	28,94* [12,328;48,382]	**0,002**
Свободный гидроксипролин (нг/ммоль Cr)	63,4948* [33,283;98,365]	91,518 [64,557;174,018]	115,391* [52,434;304,905]	**0,049**
Пептидсвязанный гидроксипролин (нг/ммоль Cr)	462,25 [299,245;733,405]	536,266 [294,486;828,092]	402,065 [266,42;741,462]	0,704
Прокальцитонин (нг/ммоль Cr)	1,43* [0,84;2,29]	4,645** [2,715;12,22]	12,308* (**) [8,1;14,54]	***0,002** ****0,034**

*критерий Краскала-Уоллиса

Медиана значений α-1-ГЛ была самой низкой у больных с генотипом I/I, в то время как у детей с генотипом D/D медиана значений α-1-ГЛ была максимальной (p=0,046,) что подтверждается установленной корреляционной связью между генотипом D/D у детей с РН, с одной стороны, и уровнем α-1-ГЛ в моче с другой (r=0,36, p=0,05).

Установлены статистически значимые различия уровней МАУ в зависимости от генотипов гена *ACE*: у больных с генотипом D/D и I/D уровень альбумина в моче был значимо выше при сравнении с больными с генотипом I/I (p=0,0001), что согласуется и с данными других исследований (Ai J.W., 2016; Życzkowski M., 2017). Медиана значений МАУ была статистически значимо выше у детей с генотипом D/D по сравнению с пациентами с генотипом I/I (p=0,002) и не отличалась у детей с генотипом I/D (p>0,05), что подтверждается установленной корреляцией между уровнем МАУ в моче и генотипом D/D (r=0.312, p=0,046) и свидетельствует о тубулярном повреждении. Проведенный анализ концентрации β2-МГ в моче выявил, что у детей с генотипом D/D медиана значений β2-МГ была значимо выше, чем у детей с генотипом I/I (p=0,004).

Выявлены процессы активного коллагенообразования у больных с генотипом D/D: медиана значений СВО превышала таковую при сравнении с больными с генотипом I/I, что подтверждается корреляционной связью между уровнем СВО с одной стороны и генотипом D/D, с другой (r=0,53, p=0,029). При этом медиана значений ПСО статистически значимо не отличалась у пациентов с различными генотипами гена *ACE*.

Более высокая медиана значений ПКТ наблюдалась у детей с генотипом D/D по сравнению с детьми с генотипом I/I (p=0,002) и была статистически выше по сравнению с пациентами с генотипом I/D (p=0,034). Следовательно, полиморфизм генотипов гена *ACE* является независимым предиктором развития почечного повреждения у детей с ПМР.

Доказано, что для детей с генотипом D/D гена *ACE* характерны: более высокая степень ПМР, более тяжелая стадия РН, снижение функции почек в виде снижения СКФ и концентрационной функции почек, статистически значимое повышение мочевого уровня AngII и TGF-β1, МАУ и β2-МГ, СВО, α-1-ГЛ и ПКТ.

Моделирование нефросклероза и определение маркеров развития и прогрессирования нефросклероза у крыс

С целью определения этапов развития и прогрессирования РН в эксперименте изучена динамика морфологических изменений в почках у крыс и проведён статистический анализ таких морфологических изменений как клеточная инфильтрация, интерстициальный отек, интерстициальный фиброз, полнокровие клубочков в зависимости от экспериментальной модели, наличия ПМР и длительности воздействия патологического фактора, а также определена эффективность применения иАПФ.

Крысам на 1, 3 и 6 месяцах исследования проводилась цистография. У 22/42 (52,3%) особей выявлен односторонний или двухсторонний ПМР. Следует отметить, что при всех экспериментальных моделях, наблюдалось синхронное нарастание частоты ПМР с длительностью сохранения обструкции мочевых путей (рисунок 13).

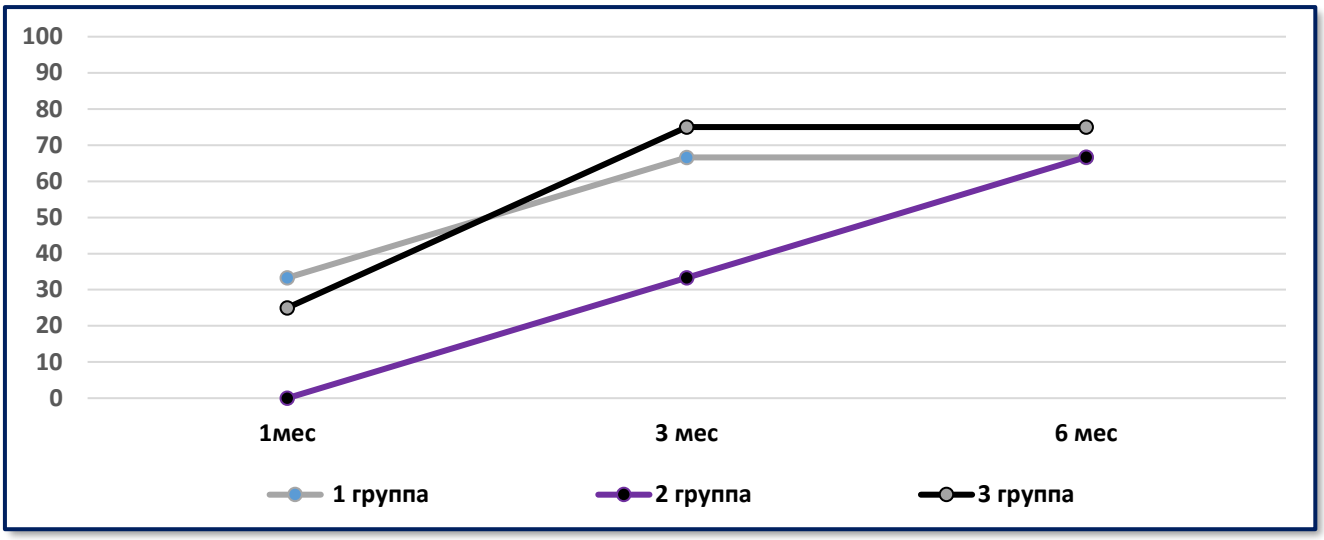
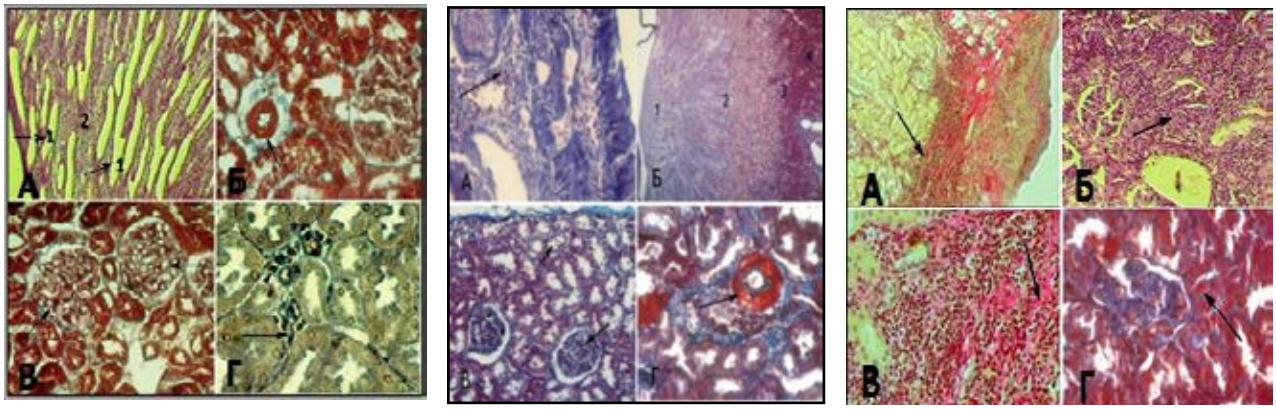


Рисунок 13 - Частота (%) развития ПМР от времени его диагностирования в изучаемых группах крыс (n=45)

Установлено, что уровень клеточной инфильтрации в почечной ткани на 1, 3 и 6 месяцах эксперимента был значимо выше у крыс при сочетании обструкции и инфицирования мочевого пузыря, чем у крыс только со стенозом уретры (p<0,01). Наиболее высокий уровень клеточной инфильтрации в почечной ткани был у крыс с инфицированием мочевых путей на 3 и 6 месяцах эксперимента по сравнению с остальными группами (p<0,05).

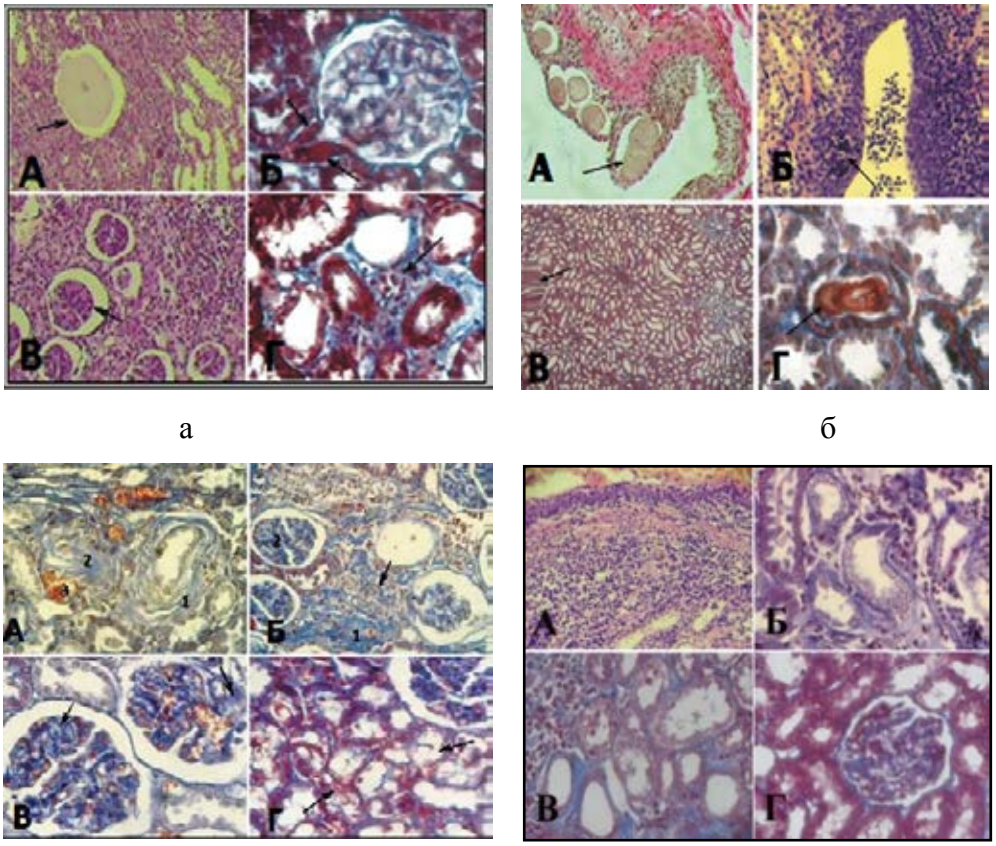
Наиболее выраженное полнокровие клубочков и интерстициального отека отмечено у особей всех групп на 3 и 6 месяцах эксперимента.

При анализе выраженности тубулоинтерстициального фиброза в почечной ткани крыс на всех этапах наблюдения различия между изучаемыми подгруппами были видны уже на 1 месяце эксперимента: более высокий уровень интерстициального фиброза выявлен у особей с ПМР и без терапии иАПФ (модель 3А) при сравнении с особями на терапии иАПФ (модель 3Б) (рисунки 14, 15,16)



а б в

Рисунок 14 - Морфологические изменения у крыс с ПМР на **1 месяце эксперимента**: а - модель 1, б - модель 3А (без терапии иАПФ), в - модель 3Б (на терапии иАПФ).



а б

в с

Рисунок 15 - Морфологические изменения у крыс с ПМР **на 3 месяце эксперимента**: а - модель 1, б - модель 2, в - модель 3 (без терапии иАПФ), с - модель 3 (на терапии иАПФ).

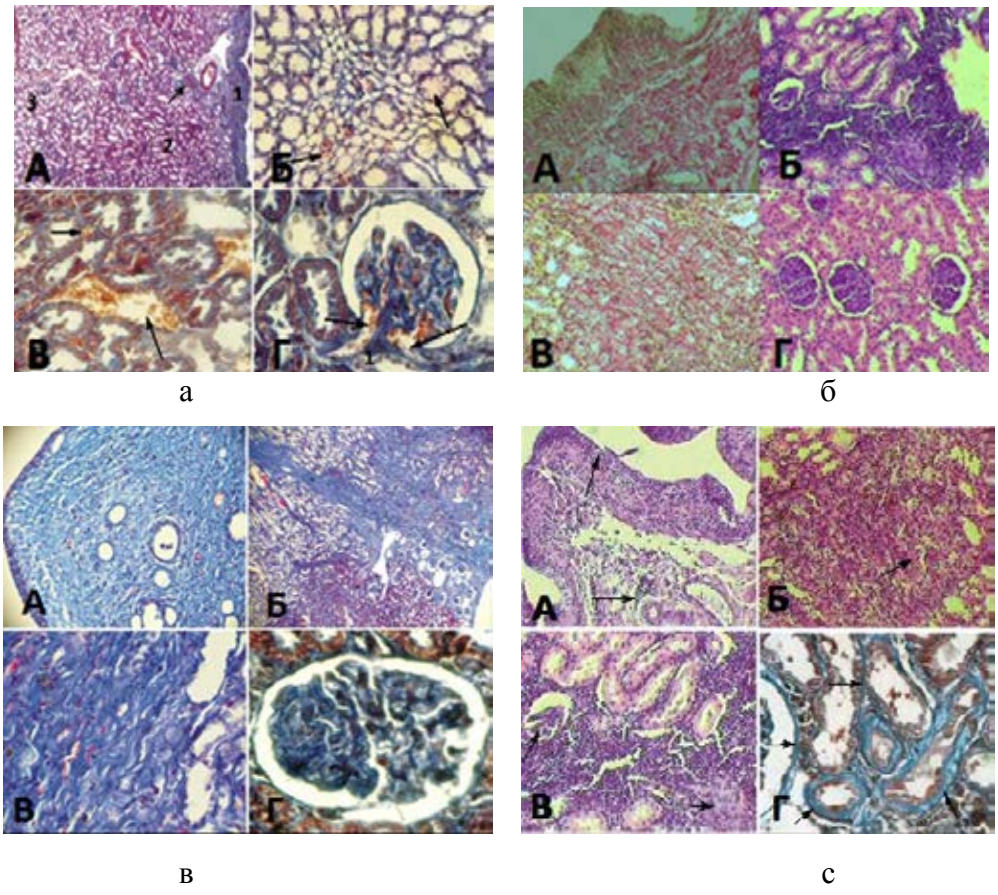


Рисунок 16 - Морфологические изменения у крыс с ПМР **на 6 месяце эксперимента**: а - модель 1, б - модель 2, в - модель 3 (без терапии иАПФ), с - модель 3 (на терапии иАПФ).

В результате проведённого сравнительного гистологического анализа доказано, что при инфицировании мочевой системы и стенозе уретры возникшие воспалительные процессы в разной степени захватывают все компоненты почечно-мочеточникового комплекса с неоднородными макро- и микроскопическими изменениями начиная с 1 месяца эксперимента. Выявленные нарушения в почечной паренхиме сопровождались интерстициальным отёком различной степени выраженности, дистрофией и ишемией с исходом в тубулоинтерстициальный фиброз с нарастанием к 3 месяцу эксперимента. Рассматриваемые нами пролиферативные изменения и наличие клеточного компонента гранулоцитарного ряда лейкоцитов на 6 месяце исследования свидетельствуют об активности остаточных постинфекционных изменений и вновь образующихся паренхиматозных повреждений (чаще при ПМР), несмотря на проводимую антибактериальную терапию, что характеризует длительность прогрессирования морфологических изменений.

Установлено, что при снижении активности воспалительных изменений в почечной ткани на 6 месяце эксперимента имеются стойкие сосудистые нарушения и прогрессирование

процессов склерозирования. Другим немаловажным фактом, наблюдаемым в настоящем эксперименте, явилось сочетание пиелонефрита с пролиферативным гломерулитом, что также способствует прогрессированию нефропатии.

С целью определения влияния иАПФ (эналаприла) на маркеры склерозирования и факторы роста была исследована мочевая экскреция ферментов, микроальбуминурии и профиброгенных факторов роста, показателей коллагенообразования в 3А и 3Б подгруппах с моделированным стенозом уретры и инфицированием мочевых путей (n=24) на 1, 3 и 6 месяцах эксперимента и в группе контроля (4 группа, n=3).

Установлено, что у особей 3А подгруппы, не получавших лечение иАПФ, выявлена повышенная экскреция AngII, TGF-β1, β2-МГ, МАУ и СВО с мочой на всех месяцах наблюдения по сравнению с его уровнем у крыс контрольной группы (p<0,05). Выраженное снижение уровней AngII, TGF-β1, β2-МГ, МАУ и СВО с мочой установлено у особей на терапии иАПФ начиная с 3 месяца эксперимента, и значимое снижение уровней на 6 месяце эксперимента (p<0.05), что свидетельствует о восстановлении эпителия проксимальных канальцев и подтверждает нефропротективный эффект иАПФ.

Эффективность применения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента у детей с рефлюкс-нефропатией

Проанализирована эффективность ренопротективной терапии иАПФ у 99/117 (84,6%) пациентов с различной тяжестью РН. Из исследования были исключены дети без признаков РН – 18 пациентов (15,4%).

При включении в исследование все пациенты были в стадии клинико-лабораторной ремиссии инфекции мочевой системы не менее 3 месяцев, ни одного пациента не было с ХПН.

На момент включения в исследование никто из пациентов с ПМР не получал нефропротективную терапию.

В зависимости от применения терапии иАПФ и тяжести РН 99 пациентов были разделены на 2 группы и 4 подгруппы:

- 1 группа – 42/99 ребенка (42,4%) с А и В типами РН:
- 1А подгруппа – 24/42 (57,1%) пациента, получавших лечение эналаприлом
- 1Б подгруппа – 18/42 (42,9%) пациента, не получавших лечение эналаприлом
- 2 группа – 57/99 (57,6%) пациентов с С и D типами РН:
- 2А подгруппа – 33/57 (57,9%) пациентов, получавших лечение эналаприлом
- 2Б подгруппа – 24/57 (42,1%), не получавших терапию иАПФ

Не установлено значимых различий по полу и возрасту в исследуемых подгруппах (p>0,05). Показателями эффективности терапии были: динамика прогрессирования РН по данным статической нефросцинтиграфии, степень нарушения функциональных параметров почек (концентрационная функция почек, СКФ, уровень альбуминурии, показатели внутрипочечной гемодинамики), а также влияние иАПФ на маркеры склерозирования, коллагенообразования, показатели тубулярной дисфункции и повреждение гломерулярного фильтра. Динамика склеротических изменений на фоне терапии и без терапии иАПФ у детей по данным повторной статической нефросцинтиграфии с ДМСА представлена на рисунке 17.

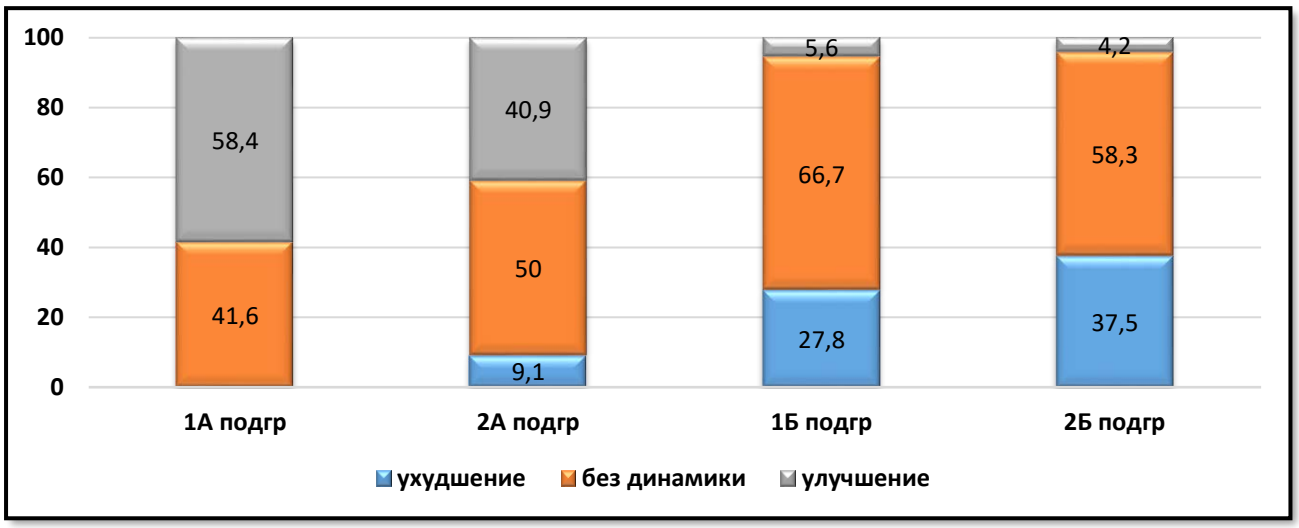


Рисунок 17 - Динамика склеротических изменений по данным повторной ДМСА сцинтиграфии почек у обследуемых детей с/без терапии иАПФ (n=99), %

По результатам исследования уже через 12 месяцев на терапии иАПФ у детей с А и В типами РН концентрационная и фильтрационная функции почек во всех случаях оставались сохранными; ни у одного больного не было формирования ХБП 2 ст.; выявлена нормализация скоростных характеристик в 79,2% случаев (62,5% исходно) и показателей периферического сопротивления в 83,3% случаев (58,3% исходно) у большинства больных по данным УЗДГ почек, а также установлено снижение мочевых уровней профиброгенных маркеров, СВО, микроальбумина и ПКТ.

В динамике наблюдения, у пациентов с А и В типами РН, не получавших терапию иАПФ, имело место повышение экскреции с мочой AngII, TGF-β1, МАУ, β2-МГ, СВО и ПКТ; ухудшились функциональные показатели у 2 (11,1%) больных развилась ХБП 2 ст., (что на 1 больного больше в сравнении с исходными данными), в 56,6% случаях сохранялось снижение концентрационной функции почек, снижение индексов резистентности выявлено в 16,7%

случаях (5,6% исходно, что на 10% выше), снижение скорости кровотока так же выявлено в 16,7% случаях (что, в 3 раза больше исходных, $p<0,05$).

Несмотря на длительный прием иАПФ (в течение 12 месяцев), у больных с С и D типами РН на терапии иАПФ снижение концентрационной функции сохранялось в 18,2% случаев. В 6,1% случаев имело место ХБП 2 ст. (без ухудшения в динамике при сравнении с исходными данными); установлена нормализация показателей периферического сопротивления в 75,8% случаев (54,5% исходно), а нормализация почечного кровотока в 84,8% случаев (30,3% исходно). Экскреция AngII, TGF-β1, МАУ, β2-МГ, СВО и ПКТ в моче снизилась на 30-40%, но сохранялась повышенной при сравнении с больными А и В типами, несмотря на терапию иАПФ, и рассматривается нами как показатель прогрессирования РН.

У больных с С и D типами РН без терапии иАПФ отмечалось значимое увеличение экскреции с мочой AngII, TGF-β1, ПКТ, МАУ и β2-МГ на 60-70%, повышение уровня СВО в моче в 3 раза в сочетании с нарушением концентрационной функции - в 79,2% случаев (52,6% исходно); в 25% случаев выявлено развитие ХБП 2 ст. (12,5% исходно); снижение индексов периферического сопротивления - в 25% (16,7% исходно) и скорости кровотока в 33,3% (vs 20,9% исходно) случаев соответственно. Выявленная прямая корреляция между МАУ и уровнем экскреции с мочой показателей обмена коллагена отражает как наличие тубулярных нарушений, так и активацию механизмов фиброгенеза, которые являются звеньями процессов ремоделирования тубулоинтерстиция почки при РН.

Не выявлено значимого снижения уровня МАУ у больных с D/D генотипом гена *ACE* в обеих подгруппах на терапии иАПФ до уровня в контрольной группе. Анализ связи генотипов гена *ACE* с нефропротективным эффектом применения иАПФ по уровню микроальбуминурии установил, что до терапии иАПФ медиана значений МАУ была статистически значимо выше у детей с генотипом D/D по сравнению с пациентами с генотипом I/I. На терапии иАПФ установлено снижение МАУ в моче у детей с генотипом I/I, по сравнению с пациентами с генотипом D/D (p=0,01).

В результате проведенного исследования установлена эффективность терапии иАПФ у детей с РН независимо от степени тяжести, что проявилось в улучшении функционального состояния почек в виде повышения СКФ и нормализации концентрационной функции почек, а также в улучшении параметров внутрипочечной гемодинамики, в снижении уровня мочевой экскреции профиброгенных факторов, МАУ, β2-МГ и ПКТ, что подтверждается нашими экспериментальными данными.

У детей с РН, не получавших терапию иАПФ, установлено прогрессирование заболевания, что проявлялось снижением функциональных параметров почек, снижением показателей

внутрипочечной гемодинамики, увеличением мочевой экскреции профиброгеных факторов, коллагенобразования, МАУ, β2-МГ и ПКТ.

Установлено, что нефропротективное действие иАПФ наиболее эффективно на ранних стадиях (А и В типы) РН за счет ингибирования свободного оксипролина в почечной ткани, что позволяет сохранить и даже улучшить почечные функции, тем самым отдаляя срок развития терминальной стадии ХПН. У пациентов с ПМР без признаков РН по данным статической нефросцинтиграфии, но с повышенным уровнем мочевой экскреции профиброгенных факторов роста и свободного оксипролина показано назначение иАПФ для профилактики развития нефросклероза.

Модель индивидуального прогноза развития и прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей

При помощи линейных логистических моделей был отобран единственный статистически достоверный фактор инициации развития РН – **ПМР.**

В ходе последующих расчётов была разработана модель порядковой логистической регрессии, с помощью которой можно предсказывать вероятность развития данного состояния. Для расчета вероятности развития РН той или иной стадии необходимо знать только степень ПМР пациента. Так, для пациента с ПМР I ст. наиболее вероятным будет В тип РН; для пациента с ПМР II ст. – С тип РН; для пациента с ПМР III ст. – также С тип РН; для пациента с ПМР IV ст. – С и D типы РН. При этом, по мере утяжеления ПМР вероятность развития более легких стадий – А и В типов – значимо снижается (рисунок 18).

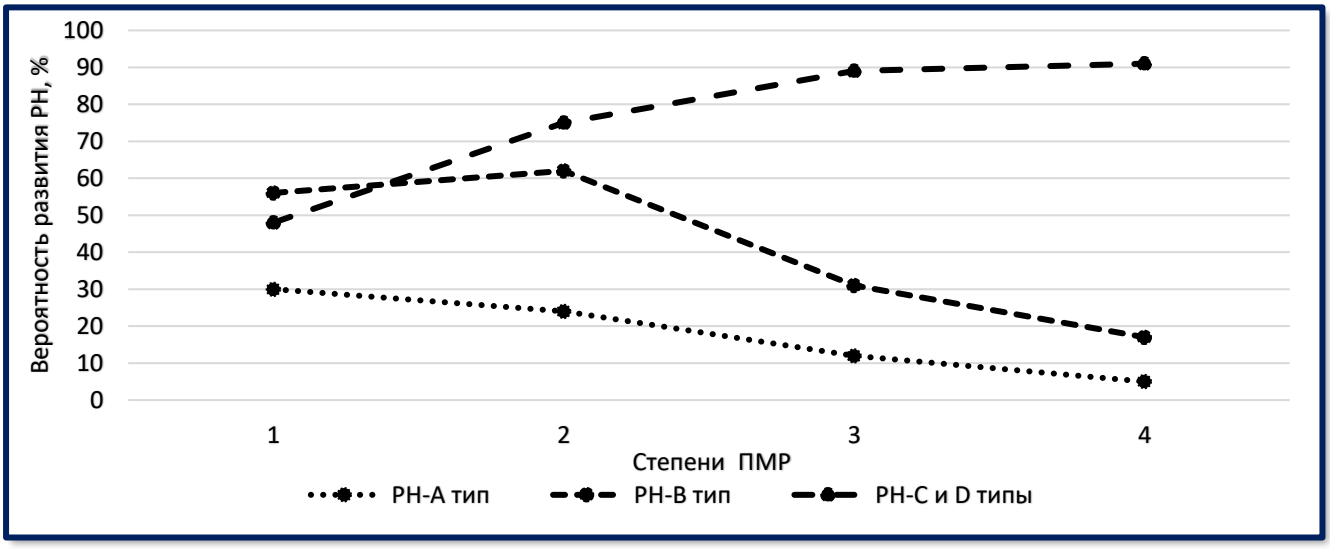


Рисунок 18 - Зависимость вероятности развития различной тяжести РН от степени ПМР

В результате логистического регрессионного анализа были получены следующие данные со статистической достоверностью выше порогового уровня ($p<0,05$). Наибольшее значение RR (6,34) получено у пациентов в зависимости от СКФ, означающее, что у пациентов с СКФ <90 мл/мин/1.73 м^2 RR развития РН (любой степени) в 6 раз выше, чем у пациентов с СКФ > 90 мл/мин/1.73 м^2. Другим существенным фактором стал ген *ACE* с RR = 5,12. Для его интерпретации следует учитывать, что данные по признаку были распределены в соответствии с повышающейся порядковой шкалой: 1 – (I/I) доминантная гомозигота; 2 – (I/D) гетерозигота; 3 – (D/D) рецессивная гомозигота. Это означает, что у детей с D/D генотипом – риск развития РН в 5 раз выше, чем у пациентов с I/I и I/D генотипами.

Количество обострений ИМС (3 и более в год) с RR=3,85 говорит о том, что при каждом увеличении числа обострений на 1 единицу риск развития РН повышается в 3,85 раза.

В отличие от вышеописанных показателей, ПКТ, α-1-ГЛ и AngII являются количественными, поэтому заключения по этим показателям аналогичны друг другу и различаются лишь значениями RR (1,34; 1,10; 1,06 соответственно). Эти данные означают, что при увеличении ПКТ и др. показателей на 1 ед. измерения риск развития повышается на 34%, 10% и 6%, соответственно. Например, при увеличении ПКТ на 10 ед. риск развития повышается на 340% (в 4,4 раза), α-1-ГЛ– на 100% (в 2 раза), AngII – на 60%, соответственно.

Предикторы формирования рефлюкс-нефропатии у детей представлены на рисунке 19.

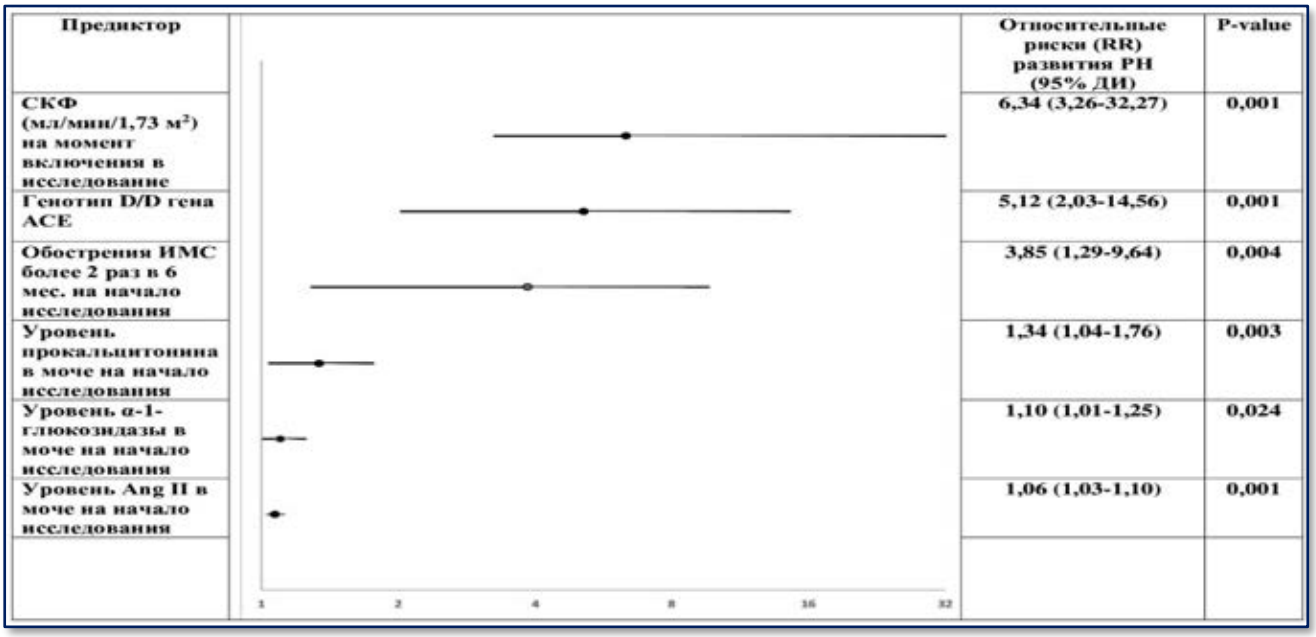


Рисунок 19 - Факторы инициации. Риск развития (RR) РН среди всех пациентов. На графике отражены относительный риск (RR) и 95% доверительный интервал.

Определены основные факторы прогрессирования РН (рис.20).

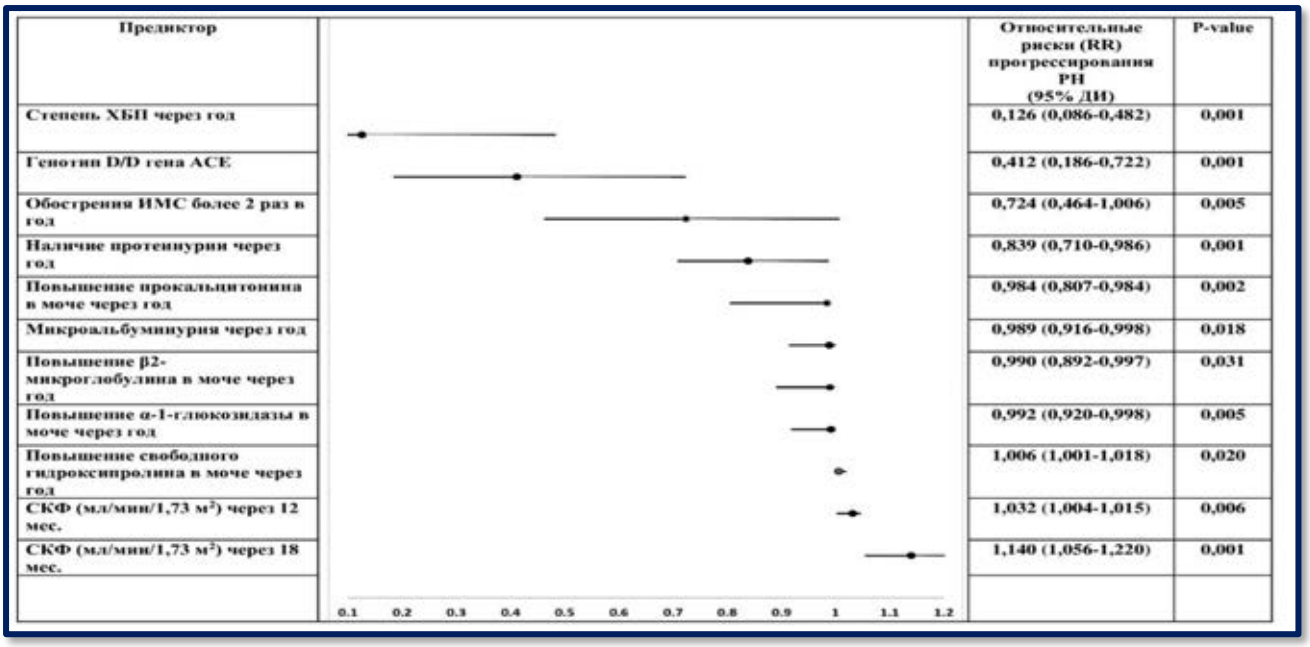


Рисунок 20 - Факторы прогрессирования. Относительные риски (RR) прогрессирования РН среди всех пациентов с ПМР. На графике отражены отношения рисков и 95% доверительный интервал.

Наибольшее влияние имеет СКФ с RR=0,126, означающее, что при повышении тяжести ХБП на 1 степень, т.е. снижении СКФ <90 мл/мин, RR того, что без терапии иАПФ у пациента с РН будет наблюдаться вариант «отсутствие ухудшения» и «улучшение» степени РН уменьшается на 87% (т.е. в 8 раз). При повышении тяжести ХБП на 2 степени риск возрастает более, чем в 64 раза. И, наоборот, при повышении уровня СКФ >90 мл/мин у больных на терапии иАПФ RR развития варианта «отсутствие ухудшения» и «улучшение» степени РН повышается в 8 раз. Например, RR ухудшения степени РН у пациентов из группы ХБП 2 ст. будет в 8 раз выше, чем у пациентов с 1 ст. ХБП.

Существенным фактором, предрасполагающим к прогрессированию РН, является ген *ACE* – RR=0,412. Это означает, что при наличии генотипа I/I и I/D чаще возникает вариант «не ухудшение/улучшение» степени РН, что в 2,5 раза выше, чем у детей с генотипом D/D.

Таким образом, нами создана модель индивидуального прогноза течения РН: снижение СКФ является неблагоприятным признаком, более характерным для тяжелой стадии (С и D типы) РН, особенно при ее прогрессирующем течении. С увеличением длительности заболевания усугубляются склеротические процессы в почках, что доказывается увеличением уровня AngII и TGF-β1 в моче при любых типах РН и их прямой корреляционной связью со склеротическими изменениями по данным ДМСА-сцинтиграфии в динамике наблюдения. Следовательно,

повышенная мочевая экскреция AngII и TGF-β1 может использоваться в качестве маркеров развития склеротических изменений в почечной ткани у детей с ПМР, а повышенный мочевой уровень β2-МГ свидетельствует о прогрессировании нефросклероза и согласуется с данными Babu R. (2017). Установленная прямая корреляционная связь между уровнем мочевой экскреции изучаемых маркеров и степенью тяжести РН у больных с ПМР доказывает возможность их использования в качестве маркеров ранней диагностики и прогнозирования прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей.

На основании полученных данных создан алгоритм, позволяющий с чувствительностью 88,1%, специфичностью 100% определить риск развития у больных с ПМР при уровне AngII в моче более 50 нг/ммоль (рисунок 21).

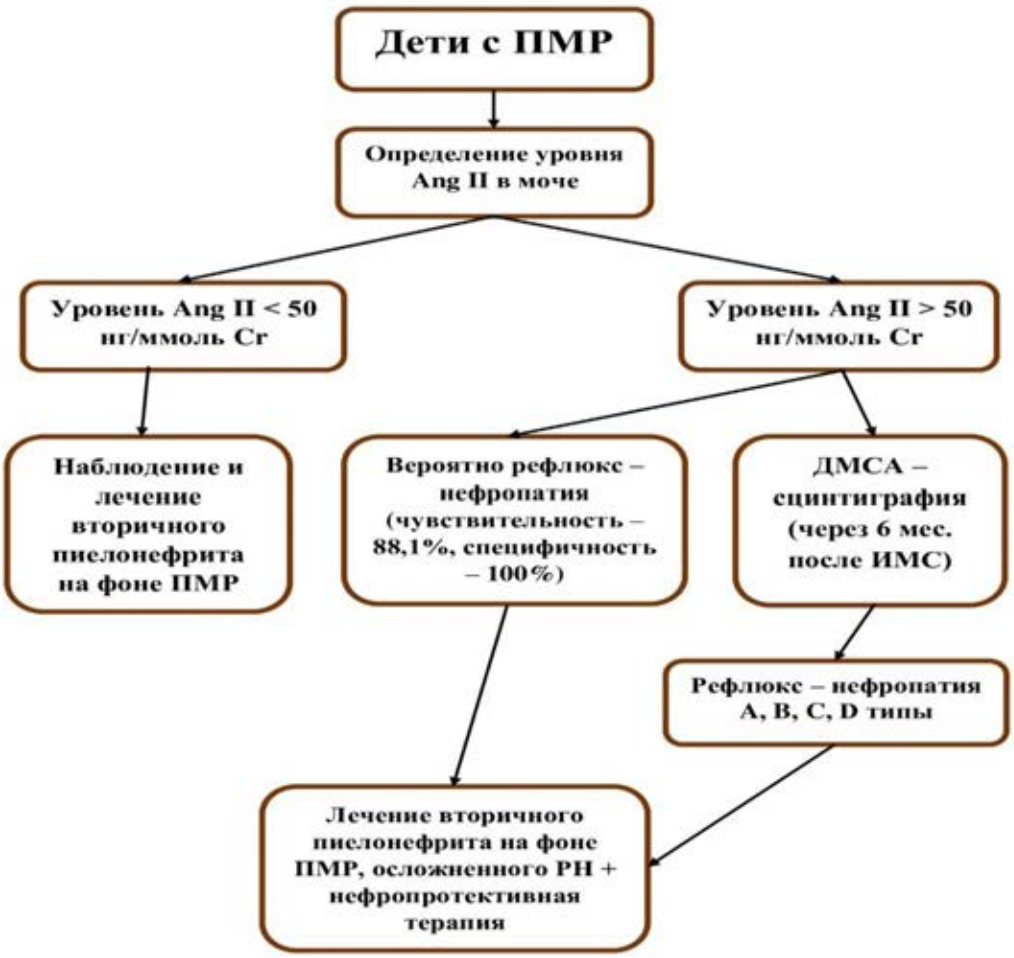


Рисунок 21 - Алгоритм прогнозирования развития рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом

Нами разработан алгоритм, позволяющий прогнозировать стабильное или прогрессирующее течение рефлюкс-нефропатии на основании определения уровня ПКТ в моче

(чувствительность 72,7%, специфичность 68,2%). При концентрации в моче ПКТ менее 4,8 нг/ммоль Cr прогнозируется стабильное течение РН, при уровне ПКТ более 4,8 нг/ммоль Cr у больного прогнозируется прогрессирующее течение РН, что требует коррекции дозы иАПФ с проведением ДМСА-сцинтиграфии 1 раз в год и наблюдения нефролога не менее 3 раз в год. Мочевой уровень ПКТ целесообразно определять в динамике всем детям с РН не менее 2 раз в год (рисунок 22).

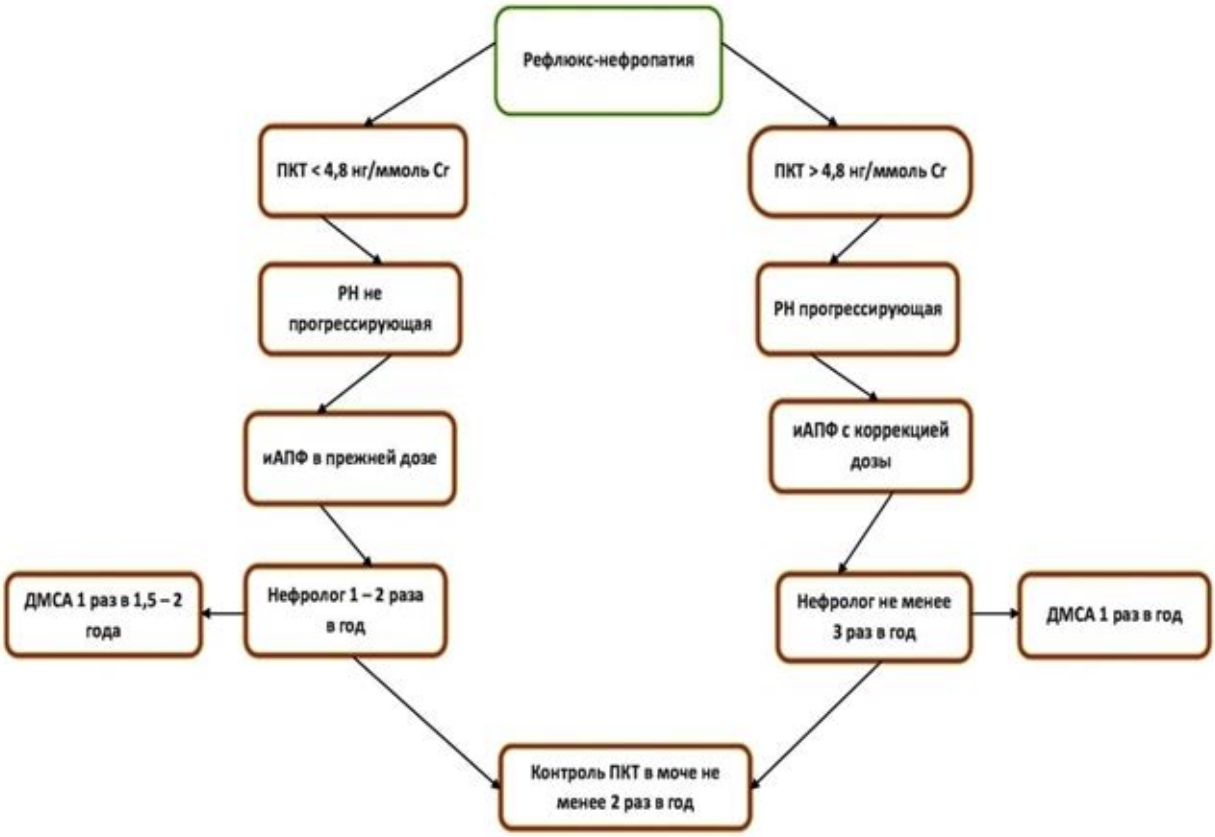


Рисунок 22 - Алгоритм прогнозирования течения рефлюкс-нефропатии у детей с ПМР и назначения нефропротективной терапии (иАПФ)

ВЫВОДЫ

1. Прогрессирование тубулоинтерстициального поражения почек у детей с рефлюкс-нефропатией обусловлено преимущественным влиянием высоких степеней пузырно-мочеточникового рефлюкса, ассоциированных с аллельным полиформизмом гена *ACE* – генотипом D/D и часто рецидивирующей инфекцией мочевой системы.
2. Доказана зависимость развития рефлюкс-нефропатии от степени пузырно-мочеточникового рефлюкса: при пузырно-мочеточниковом рефлюксе I степени рефлюкс-нефропатия выявляется в 68,4%, при пузырно-мочеточниковом рефлюксе II степени рефлюкс-нефропатия определяется в 87,5%, при пузырно-мочеточниковом рефлюксе III степени рефлюкс-

нефропатия выявляется 93,4% и при пузырно-мочеточниковом рефлюксе IV степени рефлюкс-нефропатия наблюдается у всех детей.

3. Риск развития рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом более чем в 10 раз выше при уровне ангиотензина II в моче более 50 нг/ммоль Cr.
4. У пациентов с пузырно-мочеточниковым рефлюксом с генотипом D/D гена *ACE* почти в 10 раз чаще формируются тяжелые (C и D) стадии рефлюкс-нефропатии, чем у детей с генотипом I/I.
5. У детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом высокочувствительным маркером высокого риска развития рефлюкс нефропатии и формирования тяжелых и прогрессирующих форм заболевания является уровень прокальцитонина более 4,8 нг/ммоль Cr.
6. Прогрессирование тубулоинтерстициального поражения почек при рефлюкс-нефропатии характеризуется постадийным увеличением мочевой экскреции профиброгенных факторов, β2-микроглобулина, прокальцитонина и свободного оксипролина с одновременным постадийным снижением мочевого уровня пептид-связанного оксипролина.
7. Определены различия в формировании и прогрессировании нефросклероза у крыс с экспериментальным пузырно-мочеточниковым рефлюксом стерильным или инфицированным. Наиболее быстрое и выраженное развитие тубулоинтерстициального фиброза наблюдается у крыс с инфицированным пузырно-мочеточниковым рефлюксом, несмотря на проведенную антибактериальную терапию.
8. Раннее назначение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента более чем в 3 раза снижает выраженность тубулоинтерстициального фиброза у крыс с инфицированным пузырно-мочеточниковым рефлюксом и почти в 2 раза снижает мочевую экскрецию ангиотензина II, β2-микроглобулина и свободного оксипролина. В отличие от этого, у крыс с инфицированным пузырно-мочеточниковым рефлюксом, но не получавшим ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента в динамике наблюдения отмечалось увеличение мочевой экскреции в 1,5 и более раза ангиотензина II, микроальбумина, β2-микроглобулина, α-1-глюкозидазы и свободного оксипролина.
9. У детей с начальными (A и B) стадиями рефлюкс-нефропатии использование ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента привело к уменьшению выраженности тубулоинтерстициального процесса почти у 2/3 детей и ни в одном случае не выявлено ухудшения тубулоинтерстициального процесса. В отличие от этого, у более чем ¼ пациентов с легкими (A и B) стадиями рефлюкс-нефропатии, не получавших ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, наблюдалось увеличение очагов склероза в почечной ткани.
10. При тяжелых (C и D) стадиях рефлюкс-нефропатии у детей, получавших ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента более чем в трети случаев наблюдалось уменьшение

выраженности тубулоинтерстициального повреждения, а у каждого десятого наблюдалось прогрессирование процесса. В отличие от этого, в группе детей с тяжелыми (C и D) стадиями рефлюкс-нефропатии, не получавших ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, увеличение очагов склероза в почечной ткани наблюдалось в 4 раза чаще.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая высокую частоту развития рефлюкс-нефропатии у детей с низкими степенями ПМР рекомендуется проведение реносцинтиграфии с ДМСА всем детям независимо от степени ПМР.
2. Для прогнозирования повреждения почечной ткани у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом рекомендуется использовать разработанный алгоритм с определением мочевого уровня ангиотензина II. При мочевом уровне ангиотензина II более 50 нг/ммоль Cr можно с высокой вероятностью предполагать развитие рефлюкс-нефропатии.
3. У детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом для прогнозирования риска тяжелого течения рефлюкс-нефропатии рекомендуется определение полиморфизма гена *ACE*: при генотипе D/D гена *ACE* с высокой вероятностью можно прогнозировать тяжелые (C и D), а у детей с генотипом I/I гена *ACE* – легкие (A и B) стадии рефлюкс-нефропатии.
4. Для раннего выявления детей с тяжелыми и прогрессирующими вариантами рефлюкс-нефропатии рекомендуется определять мочевой уровень прокальцитонина. У детей с мочевым уровнем прокальцитонина более 4,8 нг/ммоль Cr с высокой степенью вероятности можно прогнозировать тяжелые (C и D) стадии и прогрессирующее течение рефлюкс-нефропатии.
5. Для динамического наблюдения за течением тубулоинтерстициального поражения у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом рекомендуется комплексное определение мочевых уровней профиброгенных факторов, β2-микроглобулина, прокальцитонина и свободного оксипролина.
6. Для повышения эффективности ренопротективной терапии рекомендуется применять ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента уже на начальных стадиях (A и B) рефлюкс-нефропатии, до развития артериальной гипертензии и появления альбуминурии/протеинурии. Эффективность терапии оценивать по данным допплерографического исследования кровотока на междолевых артериях и мочевому уровню прокальцитонина и ангиотензина II.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Rusnak, F. Sing of scarring during remission of obstructive pyelonephritis / F. Rusnak, **N. Zaikova**, V.Trenev // Pediatric Nephrology - 2007. - V.22. – P.1562

2. **Зайкова, Н.М**. Факторы риска и патогенетические механизмы формирования и прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей /Н.М. Зайкова // **Российский вестник перинатологии и педиатрии**. - 2008. - № 1. - С.63-70.
3. Лепаева, Т.В. Диагностическое значение микроальбуминурии у детей с рефлюкс-нефропатией тезис / Т.В. Лепаева, В.В. Длин, И.В. Казанская, **Н.М Зайкова** // Современные технологии в педиатрии и детской хирургии. - 2008. – С. 236-237.
4. Лепаева, Т.В. Микроальбуминурия при рефлюкс-нефропатии у детей/ Т.В. Лепаева, Длин, И.В. Казанская, **Н.М Зайкова** // **Нефрология и диализ.** -2009. -Т.11(1). – С. 31-34.
5. **Zaikova**, **N.** Caracteristica hemodinamicii renale la copii cu differite grade de reflux vesico-ureteral / N. Zaikova, A. Caraman, P. Stratulat // Вестник перинатологии. Кишинев, Молдова. - 2009.- Т.43.-№3. – С.148- 153.
6. **Zaikova, N.** Assessment markers of sclerosis and collagenopathy in the diagnosis of reflux nephropathy in children with vesicoureteral reflux / A. Caraman, N. Zaikova, P. Stratulat // Pediatric Nephrology. -2009. – V.24. – P.1869-1870 .
7. **Zaikova, N.M.** Urinary levels of TGF-β1 in patients with vesicoureteral reflux and renal parenchymal scar / N. M. Zaikova, V.G. Rotaru, P.M. Stratulat // Pediatric Nephrology. -2010. – V.25. – P.1928.
8. **Зайкова, Н. М.** Диагностическое значение профиброгенного медиатора TGF-β1 в определении степени тубулоинтерстициального фиброза у больных с пузырно-мочеточниковым рефлюксом / Н. М. Зайкова // Curierul medical, Кишинев, Молдова. -2010. -Т.318. -№5. - С.49 -52.
9. **Зайкова, Н.** Экскреция TGF-β1 у детей с различными степенями пузырно-мочеточникового рефлюкса / Н. Зайкова, П. Стратулат // Педиатр. -2011. - №1 (Т.2). - С.63.
10. **Зайкова, Н. М**. Диагностическое значение экскреции TGF-β1 в моче у детей с различными степенями пузырно-мочеточникового рефлюкса в зависимости от терапевтического подхода / Н. М. Зайкова, О.В. Бербека, П.М. Стратулат // Украинский журнал нефрологии и диализа. -2010. - №3 (Т.27). - С.34 -35.
11. **Зайкова, Н.** Некоторые клинико-морфологические особенности абактериальной рефлюкс-нефропатии при моделированном стенозе уретры у крыс/ Наталья Зайкова, В. Давид, Р. Нигуляну // Cuirerul medical, Кишинев, Молдова. - 2010. – С. 65-71.
12. **Зайкова, Н. М**. Динамика патологических изменений в паренхиме почек при инфицированном и неинфицированном пузырно-мочеточниковом рефлюксе у крыс (экспериментальное исследование)/ Н.М.Зайкова, В.В. Длин, В.Г. Петрович // **Клиническая нефрология**. -2011. - №5.- С. 64-72.
13. **Zaikova, N.** The development of interstitial fibrosis after bacterial pyelonephritis in rats / N. Zaikova, V.David, V.Petrovici // Pediatric Nephrology.-2011. – V.26. – P.1725-1726.
14. **Зайкова, Н. М**. Прокальцитонин в моче – как маркер тяжести повреждения почечной ткани у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом / Н. М. Зайкова, В. В. Длин, Л. А. Синицына // **Нефрология**. - 2012. –№4 (Т. 16). - С. 69-74.
15. **Зайкова, Н. М**. Динамика морфологических изменений в почках у крыс при инфекции мочевых путей / Н. М. Зайкова, В.Г. Петрович, Л.А. Синицына // Curierul medical, Кишинев, Молдова. -2012. - -№1 (Т.325). - С.10-16.
16. **Зайкова, Н. М**. Клиническая значимость мочевой экскреции ангиотензина II и трансформирующего фактора роста-β1 в определении степени рефлюкс-нефропатии у детей/ Н. М. Зайкова// Медицинский журнал, Белоруссия, Минск. -2012. -№1(Т.39). - С.38-41.
17. **Zaikova, N.** Urinary α-glycosidase and β2-microglobulin as markers of renal damage in patients with vesicoureteral reflux and renal parenchymal damage / N. Zaikova, J. Bernic, V.Ciolac // Pediatric Nephrology.-2012.- V.27. -P.1739.
18. **Zaikova, N.** Renal scar formation and urinary TGF- β1 level after treatment with antibiotics and ACE inhibitors in experimental pyelonephritis in rats / N. Zaikova, V. Dlin, A. Korsunschii // Pediatric Nephrology. -2013.- V.28. -P.1783.
19. **Zaikova, N.** The role of hydroxyprolinuria in renal scars in children with vesicoureteral reflux / N. Zaikova // Nephrol Dial Transplant. -2013. - P.1013

20. **Зайкова, Н. М**. Активность псевдохолинэстеразы и нейтральной α-глюкозидазы в моче у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом и рефлюкс-нефропатией / Н. М. Зайкова, В. В. Длин, В.С. Гудумак // **Российский вестник перинатологии и педиатрии**. -2013. -№5 (Т.58). - С.75 -81.

21. **Зайкова, Н. М**. Клиническое значение гидроксипролинурии у детей с рефлюкс-нефропатией / Н. М. Зайкова // **Нефрология**. -2013. -№3 (Т. 1).– С.68-74.

22. **Зайкова, Н. М**. Микроальбуминурия и β2-микроглобулинурия у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом и рефлюкс-нефропатией / Н. М. Зайкова, В. В. Длин, Л. А. Синицына//**Российский вестник перинатологии и педиатрии.** -2014. -№5(Т.59). - С.69-76.

23. **Zaikova, N.** Angiotensin II and β2-microglobulin in urine as diagnostic marker renal parenchymal scar in patients with vesicoureteral reflux/ N. Zaikova, J. Bernic, V.Ciolac // Pediatric Nephrology.-2014.- V.29. -P.1784.

24. Chesnaye, N**.** Demographics of paediatric renal replacement therapy in Europe: a report of the ESPN/ERA-EDTA registry / N. Chesnaye, M. Bonthuis, F. Schaefer, J.W. Groothoff, E. Verrina, J.G. Heaf, A. Jankauskiene, V. Lukosiene, E.A. Molchanova**, N. Zaikova** et al.// **Pediatric Nephrology**. -2014. –V.29(12). – P. 2403-2410.

25. Chesnaye, N. C. Disparities in treatment rates of paediatric end-stage renal disease across Europe: insights from the ESPN/ERA-EDTA registr /N. C Chesnaye, Franz Schaefer, Jaap W. Groothoff, Fergus J Caskey, J. G. Heaf, S. Kushnirenko, M. Lewis, R. Mauel, E. Maurer, J.Merenmies, D.Shtiza, R.Topaloglu, **N. Zaikova** // **Nephrol Dial Transplant**. -2015. 30(8):13 –P. 77-85.

26. **Зайкова, Н. М**. Инфекции мочевых путей: морфологические изменения в почечной паренхиме у крыс (экспериментальное исследование) / Н.М. Зайкова., В.Г. Петрович, Л.А. Синицина // **Нефрология**. -2015. - №3 (Т. 19). - С. 72-78.

27. **Зайкова, Н. М**. Полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента у детей с рефлюкс-нефропатией / Н.М. Зайкова, Д.-Д. Дулап, В. Сакарэ //**Клиническая нефрология.** -2015. -№4.- С. 42-48.

28. **Зайкова, Н. М**. Маркеры определения степени фиброгенеза у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом / Н.М. Зайкова, В.В. Длин, Л.А. Синицына// **Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского**. -2015. -№3 (Т. 94). -С. 45-51.

29. **Зайкова, Н. М**. Роль полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом в прогрессировании рефлюкс- нефропатии / Н.М. Зайкова, Д.Д. Дулап, В.А. Сакарэ // **Российский вестник перинатологии и педиатрии**.- 2015. -№4 (Т.60). - С.203 -214.

30. **Zaikova, N.** Correlation analysis between glomerular filtration rate (GFR) and urinary levels of angiotensin II (Ang II) in children with vesicoureteral reflux (VUR) and reflux nephropathy (RN)/ N. Zaikova, V. Dlin, A. Korsunschii //Pediatric Nephrology.-2015. – V.30. – P.1581-1582.

31. **Зайкова, Н. М**. Влияние ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента на уровень профиброгенных факторов роста в моче и морфологические изменения в паренхиме почек у крыс с инфицированным пузырно-мочеточниковым рефлюксом/ Н.М. Зайкова¸ В.В. Длин, В.Г. Петрович // **Нефрология**. -2016.- №3 (Т. 20). - С. 85-95.

32. **Зайкова, Н. М**. Клиническое значение статической нефросцинтиграфии у детей с рефлюкс-нефропатией/ Н.М. Зайкова, В.В. Длин, Н.Е. Ревенко /// **Вестник РНЦРР**. -2016. - №4. - С. 23-32.

33. **Зайкова, Н. М**. Роль ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента в профилактике прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом / Н.М. Зайкова, В.В. Длин, Л.А. Синицына// **Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского**. -2016. -№5(Т. 95). -С. 26-33.

34. van Huis, M. Considerable variations in growth hormone policy and prescription in paediatric end-stage renal disease across European countries-a report from the ESPN/ERA-EDTA registry / M. van Huis, M. Bonthuis, E. Sahpazova, F. Mencarelli, B. Spasojević, G. Reusz, A. Caldas-Afonso, A. Bjerre, S. Baiko, K. Vondrak, E.A. Molchanova, G. Kolvek, **N. Zaikova** et al.// **Nephrol Dial Transplant**. -2016.- V.31(4). - P.609-619.

35. Hogan, J. Gender Disparities in Access to Pediatric Renal Transplantation in Europe: Data From the ESPN/ERA-EDTA Registry / J. Hogan, C. Couchoud, M. Bonthuis, J.W. Groothoff, K.J. Jager, F. Schaefer, K.J. Van Stralen, D. Shitza, R. Kramar, R. Oberbauer, S. Baiko, A. Sukalo, K. van Hoeck, F. Collart, J.M. des Grottes, D. Pokrajac, H. Resić, B. Prnjavorac, D. Roussinov, **N. Zaikova** et al.// **Am J Transplant.** -2016. -V.16(7). - P.2097-2105.
36. Tjaden, L.A. Racial Disparities in Access to and Outcomes of Kidney Transplantation in Children, Adolescents, and Young Adults: Results From the ESPN/ERA-EDTA (European Society of Pediatric Nephrology/European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association) Registry / L.A. Tjaden, M. Noordzij, K.J. van Stralen, C.E. Kuehni, A. Raes, E.A. Cornelissen, C. O'Brien, F. Papachristou, R. Kramar, R. Oberbauer, S. Baiko, A. Sukalo, K. van Hoeck, F. Collart, J.M. des Grottes, D. Pokrajac, H. Resić, B. Prnjavorac, D. Roussinov, **N. Zaikova** et al.// **Am J Kidney Dis. -**2016. – V.67(2). – P.293-301.
37. Lofaro, D. Identification of subgroups by risk of graft failure after paediatric renal transplantation: application of survival tree models on the ESPN/ERA-EDTA Registry /D. Lofaro, K.J. Jager, A. Abu-Hanna, J.W. Groothoff, P. Arikoski, B. Hoecker, G. Roussey-Kesler, B. Spasojević, E. Verrina, F. Schaefer, K.J. van Stralen, **N. Zaikova** et al.// **Nephrol Dial Transplant**. -2016. -V.31(2). – P. 317-324.
38. **Zaikova, N.** Polymorphism of the aniotensin-converting enzyme genes in children with reflux nephropathy / M. Kosyreva, N. Zaikova, V. Dlin // Pediatric Nephrology.- 2016. – V.31. – P.1796-1797.
39. **Zaikova, N.** The role of gene polymorphism of ACE and markers of sclerosis in reflux nephropathy in children with vesicoureteral reflux/ N. Zaikova, V. Dlin, A. Korsunschii // Nephrol Dial Transplant. -2017. –V.32 (1)- P.741-742
40. Infants Requiring Maintenance Dialysis: Outcomes of Hemodialysis and Peritoneal Dialysis/ E. Vidal, K.J. van Stralen, N.C. Chesnaye, M. Bonthuis, C. Holmberg, A. Zurowska, A. Trivelli, J.E.E. Da Silva, M. Herthelius, B. Adams, A. Bjerre, A. Jankauskiene, P. Miteva, K. Emirova, A.K. Bayazit, C.J. Mache, A. Sánchez-Moreno, J. Harambat, **N. Zaikova** et al. // **Am J Kidney Dis**.-2017.- V.69(5). – P. 617-625.
41. **Zaikova, N.** Assessment markers of sclerosis and collagenopathy in the diagnosis of reflux nephropathy in children with vesicoureteral reflux / N. Zaikova, V. Dlin, A. Korsunschii //Pediatric Nephrology. -2017. – V.32. – P.1700-1701.
42. **Зайкова, Н. М**. Клиническое значение определения липокалина-2, ассоциированного с нейтрофильной желатиназой у детей с острым почечным повреждением/ А.В. Еремеева, В.В. Длин, А.А. Корсунский, Н.М. Зайкова //**Клиническая нефрология**. - 2017. -№3. -С.40-45.
43. **Зайкова, Н. М**. Состояние внутрипочечной гемодинамики у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом и рефлюкс-нефропатией/ Н. М. Зайкова, В.В. Длин, А.Караман //**Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского**. -2017. -№5. – С.32-38.
44. Думова, С.В. Инфекции мочевой системы у детей. Глава 7. Пузырно-мочеточниковый рефлюкс и рефлюкс-нефропатия (под редакцией Длина В.В. Османова И.М, Чугуновой О.Л) / С.В. Думова, О.Л. Чугунова, В.В. Длин, **Н.М. Зайкова**, Т.В. Лепаева // Издательство "Оверлей" 2017. - Москва. – С. 244-267.
45. Косырева, М.А. Анализ источников литературы по проблеме качества жизни детей с хронической патологией мочевыводящей системы/ М.А. Косырева, Н.Б. Гусева, А.А. Корсунский, **Н.М. Зайкова**// **Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. -**2017. -№5. – С.32-38.
46. Баиндурашвили, А.Г. Миелодисплазия у детей (организация и оказание специализированной медицинской помощи) / А.Г. Баиндурашвили, Т.Т. Батышева, О.В. Быкова, В.Г. Гельдт, И.Н. Григович, Н.Б. Гусева, А.А. Демидов, Л.А. Дерюгина, О.А. Джерибальди, В.В. Длин, **Н.М. Зайкова** // Монография, Москва. -"Предание".- 2017. -С.320.
47. Еремеева, А.В. Клиническое значение определения липокалина-2, ассоциированного с нейтрофильной желатиназой, у пациентов с хронической болезнью почек (обзор литературы)/ А.В. Еремеева, В.В. Длин, А.А. Корсунский, **Н.М. Зайкова** // **Нефрология**. -2018. - С. 50-56.
48. Еремеева, А.В. Клинико-диагностическое значение молекулы повреждения почек -1 в моче у детей с острым пиелонефритом/ А.В. Еремеева, В.В. Длин, А.А. Корсунский, **Н.М. Зайкова** // ДОКТОР.РУ. -2018. - С.23-27.

49. Еремеева, А.В. Клинико-диагностическое значение определения липокалина-2, ассоциированного с нейтрофильной желатиназой (UNGAL), в моче у детей с дебютом пиелонефрита / А.В. Еремеева, В.В. Длин, А.А. Корсунский, **Н.М. Зайкова**// **Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского**. -2018. -№5. – С.28-34.
50. **Зайкова, Н. М**. Диагностические маркеры развития и прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей/ Н.М. Зайкова, В.В. Длин, Л.А. Синицына // Детская медицина северо-запада. - 2018. - С.37.
51. **Зайкова, Н. М**. Ранние маркеры развития и прогрессирования рефлюкс-нефропатии у детей/ Н.М. Зайкова, В.В. Длин, А.В. Еремеева// **Клиническая нефрология**-2018. -№4.- С. 55-63
52. **Zaikova, N.** Inflammatory marker and profibrotic markers of sclerosis in children with vesicoureteral reflux/N. Zaicova, V. Dlin, L. Sinitcina// Pediatric Nephrology.-2018. – V.33. – P.1847.
53. **Zaikova, N.** Early markers of the progression of reflux-nephropathy in children /N. Zaikova, V. Dlin, L. Sinitcina // Pediatric Nephrology. -2018. – V.33. – P.1865.
54. **Zaikova, N.** Reflux-nephropathy: modern approaches to diagnostics and treatment/ N. Zaikova, V. Dlin, L. Sinitcina **//Urology & Nephrology Open Access Journal**. -2019. -V. 7(4). – P.63–67
55. **Zaikova, N.** Urine PCT level as diagnostic marker renal parenchymal scar in patients with vesicoureteral reflux /N. Zaikova, I. Isaeva, V. Dlin // Pediatric Nephrology. -2019. – V.34. – P.1847.
56. **Zaikova, N.** Urine β2MG and ACE genotype polymorphisms in patients with scar formation/ N. Zaikova, V. Dlin, L. Sinitcina //Nephrol Dial Transplant. -2019.-V.34 (1) - P.1081.
57. **Зайкова, Н. М**. Проблемы диагностики рефлюкс-нефропатии у детей раннего возраста/ Н.М. Зайкова, В.В. Длин, Н.Б. Гусева //**Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского**. -2020. -№3. - С.259-264.
58. **Зайкова, Н. М**. Способ лечения детей раннего возраста с рецидивируюшей инфекцией мочевой системы / Н.М. Зайкова // **Патент на изобретение №2724186 от 23 января 2020.**

Список условных обозначений

АГ	артериальная гипертензия	тХПН	терминальная хроническая почечная недостаточность
ген *ACE*	ген ангиотензин конвертирующего фермента	УЗИ	ультразвуковое исследование почек
ДМСА сцинти графия	статическая нефросцинтиграфия с 99 мТс димеркаптосукциновой кислотой	ХБП	хроническая болезнь почек
иАПФ	ингибиторы ангиотензин превращающего фермента	AngII	ангиотензин II
ИЛ	интерлейкин	α-1-ГЛ	нейтральная α-1-глюкозидаза
ИМС	инфекция мочевой системы	β2-МГ	β2-микроглобулин
МАУ	микроальбуминурия	CAKUT-синдром	congenital anomalies of the kidney and urinary tract
ОМС	органы мочевой системы	IR	индекс резистентности
ПКТ	прокальцитонин	KIM-1	kidney injury molecule-1
ПМР	пузырно-мочеточниковый рефлюкс	L-FABP	liver type fatty-acid binding protein
ПСО	пептидсвязанный оксипролин	MCP-1	моноцитарнчый хемоатграктантный протеин-1
ПХЭ	псевдохолинэстераза	NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
РН	рефлюкс-нефропатия	r	коэффициент корреляции
СВО	свободный оксипролин	TGF-β1	трансформирующий фактор роста -β1
СКФ	скорость клубочковой фильтрации	t	коэффициент Стьюдента