

© Лучанинова В.Н., Погодаева Т.В., 2012

В.Н. Лучанинова, Т.В. Погодаева

ПРОГРАММА НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПОЧЕК*

Кафедра факультетской педиатрии ГБОУ ВПО Владивостокский ГМУ Минздравсоцразвития России,
г. Владивосток, РФ

В работе представлены методологический подход и результаты разработки этапного неонатального скрининга выбора новорожденных в группу риска развития нефропатии. С этой целью изучены 16 образцов ткани плодов и умерших новорожденных и проведено клинико-лабораторное обследование 298 новорожденных. В результате проведенного клинико-лабораторного и морфологического исследования были выделены статистически значимые закономерности повреждения почек в онтогенезе, положенные в основу многоэтапного неонатального скрининга. Составлен формализованный алгоритм выявления повреждения почек, представляющий собой систему наблюдения за ребенком с первых часов и в течение первого года жизни.

Ключевые слова: новорожденные, нефропатия, скрининг.

Authors present methodological approach to step-by-step neonatal screening for identification of neonates with risk of renal pathology and results of its usage. Data of histological examination, performed in different tissue specimens of fetuses and dead neonates and data of clinical and laboratory examination of 298 neonates are presented. Data of clinical, laboratory and histological examination permitted to detect significant statistical laws of renal damage in ontogenesis, which were used as the base of multistep neonatal screening. Authors outworked formalized algorithm for detection of renal damage which was used as system of follow up from first hours of life during all the first year of life.

Key words: neonates, nephropathy, screening.

В последние годы возросло внимание исследователей к проблеме почечной патологии у новорожденных, что связано с увеличением числа нефропатий в этом возрасте. Данные о частоте поражения почек у новорожденных крайне противоречивы [1–3]. Это связано с тем, что верификация диагноза нефропатии у новорожденных проводится довольно редко даже при наличии клинических проявлений, так как не все методы, используемые в нефрологии, применимы у новорожденных. У детей, перенесших тяжелую гипоксию, имею-

щих сопутствующие заболевания, получавших массивную терапию, частота поражения почек возрастает [4, 5]. Так, у новорожденных, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии, патология почек развивается более чем у трети больных, при этом острая почечная недостаточность диагностируется в 6–58% случаев [6, 7]. К факторам риска развития патологии мочевой системы у новорожденных относят, кроме врожденных и наследственных заболеваний, состояния, при которых имеет место

*Исследование проведено по теме НИР «Разработка методов неонатального скрининга морфофункциональных нарушений почек и кишечника», выполняемой в рамках государственного контракта № 16.512.11.2072 от 17 февраля 2011 г., шифр «2011-1.2-512-021-082» Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».

Контактная информация:

Лучанинова Валентина Николаевна – д.м.н., проф. каф. факультетской педиатрии
ГБОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет»

Минздравсоцразвития России

Адрес: 690990 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2

Тел.: (4232) 245-24-26, E-mail: lvaln@mail.ru

Статья поступила 1.06.12, принята к печати 28.06.12.

хроническая фетоплацентарная недостаточность, нередко связанная с патологией мочевой системы у матери [8]. При этом основным патогенетическим фактором, вызывающим повреждение почек плода, является хроническая внутриутробная гипоксия. Из всех органов именно гистогенез почек наиболее страдает при гипоксии [9, 10]. Нарушение гистогенеза может проявиться пороками развития почки (у $1/5$ части новорожденных) и другими достоверными критериями морфофункциональной незрелости почек – органная дисплазия [11]. В связи с этим очевидно, что значительное число пороков развития почек остается недиагностированными при рождении, а при дальнейшем росте и развитии ребенка (увеличением метаболической нагрузки) проявляются тяжелой патологией. Учитывая возможность эволюционного резерва созревания морфологических структур, при своевременном прогнозировании формирования патологии возможно создание условий для созревания нефрогенной ткани, а, значит, предупреждения развития тяжелых заболеваний [12]. В связи с этим необходимы новые диагностические приемы, позволяющие проводить пренатальную диагностику и выделять среди новорожденных группу риска по развитию почечной патологии, что и явилось целью нашего исследования: разработать систему этапного неонатального скрининга структурно-функциональных нарушений почек для определения группы риска формирования патологии почек у новорожденных.

Материалы и методы исследования

Исследование проспективное, сравнительное, состоящее из нескольких последовательных этапов:

1) для выявления информативных критериев комплексной клинической оценки степени перенесенной гипоксии группа новорожденных из 70 детей была разделена на основную (57) и контрольную (13). В основную вошли дети, рожденные от матерей с патологией органов мочевой системы (ОМС). Контрольную группу составили новорожденные, матери которых по совокупности анамнестических, клинических и лабораторных данных не имели признаков заболеваний ОМС. По другим показателям группы были референтными;

2) с целью изучения тучно-клеточной популяции у плодов и умерших новорожденных исследовали участки почечной ткани (капсула, паренхима, ткань в области ворот), полученные у 6 плодов и 10 умерших новорожденных (проживших от нескольких часов до 1 месяца) с различным гестационным возрастом (от 22 до 38 нед гестации). Основная группа: образцы ткани 8 плодов от женщин с патологией ОМС; контрольная группа – образцы ткани 8 плодов и умерших новорожденных от женщин без патологии ОМС;

3) популяция базофилов крови и их реакция на воздействие патогенных факторов изучалась в

18 образцах пуповинной крови новорожденных: основная группа – новорожденные от женщин с патологией почек (8 образцов) и контрольная – от здоровых женщин (10 образцов);

4) иммунохимическое исследование (определение уровня аутоантител к антигенам ткани почек) проводилось у 157 новорожденных: основная группа – 113 детей от женщин с патологией почек и контрольная – 44 ребенка от здоровых женщин;

5) для исследования биохимических показателей функции почек и гипоксии группа наблюдения составила 53 ребенка. Основная группа (40 детей) состояла из новорожденных, перенесших асфиксию. Контрольная группа (13 детей) включала здоровых новорожденных детей.

Таким образом, всего изучено 16 образцов ткани плодов и умерших новорожденных и проведено клиничко-лабораторное обследование 298 новорожденных.

Новорожденные находились под наблюдением с момента рождения до 3-х суток жизни.

Клиническое исследование включало объективный осмотр по известным в неонатологии методикам с использованием шкал Кайнер (оценка оптимальности течения беременности), Апгар, NTISS (Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System – неонатальная шкала степени терапевтического вмешательства). При комплексной оценке состояния новорожденного использовали анализ данных кардиотокографии (КТГ) плода.

Морфологическое исследование мастоцитов в структурах почек проводили после окрашивания препаратов по методу Леффлера. Для определения NADPH-диафоразы использован гистохимический метод по прописи Hope, Vincent (1989). Визуализация изображения всех микропрепаратов на компьютере получена с помощью видеокomпьютерной системы, смонтированной на микроскопе Axioscop (Karl Zeiss). Для описания активности тучных клеток (ТК) применен расчет индекса дегрануляции (ИД): $ИД = А/К$, где А – количество дегранулирующих клеток, К – общее количество ТК в поле зрения; величины профильного поля (ВПП): $ВПП = D_{max} \cdot D_{min}$, где D_{max} – максимальный диаметр, D_{min} – минимальный диаметр клетки.

Исследование базофилов проводили в течение 12 ч от момента забора крови, определяли содержание CD117, 34-положительных клеток методом проточной цитометрии на приборе FACSCalibur (BD, USA). Использован протокол, прилагаемый к реактивам Dako Citomation (FITC conjugated – CD34; RPE conjugated – CD117).

Иммунологическое исследование (определение уровня естественных аутоантител) проводили в пробах сыворотки крови новорожденных, используя сертифицированные тест-системы (производства МИЦ «Иммункулус», Москва) – «ЭЛИ-Висцеро-Тест», «ЭЛИ-Нефро-Тест». Анализ полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ, прилагаемых к тестам.

Таблица

**Сравнительная оценка состояния здоровья новорожденных от женщин
с патологией и без патологии ОМС**

Показатели	Основная группа (n=57)	P±mp, %	Контрольная группа (n=13)	P±mp, %	t	p
Гестационный возраст, нед	30–39	–	37–39	–	–	–
Число здоровых детей 37–39 нед	18/57	31,58±1,23	7/13	58,33±14,23	1,83	0,06
Оценка по шкале Кайнер >19 баллов	11/57	19,3±5,36	9/13	75±12,5	4,12	0,0001
КТГ <8 баллов	4/57	7,01±2,81	0/13	0	–	0,02
Апгар <7 баллов	27/57	42,11±7,04	3/13	25±12,5	1,06	0,32

Биохимическое исследование включало показатели, изменяющиеся при ишемии и нарушении функции почек (креатинин в крови и моче, лактат в крови и моче, скорость клубочковой фильтрации (СКФ), микроальбумин (МА) в моче, электролиты (Na⁺, K⁺, Cl⁻) в крови и моче), определяли с помощью системы ARCHITECT cSystems и AEROSSET. Уровень карбоангидразы в моче тестировали с использованием иммуноферментного набора для количественного определения концентраций человеческой карбоангидразы IX (CA9) в супернатанте клеточных культур, сыворотке, плазме и моче. Кат. № DCA900-96 определений, версия: 751682.1 01/07.

Статистическая обработка выполнена методами параметрического и непараметрического анализов [13]. Из показателей описательной статистики рассчитывали средние арифметические значения (M, P), стандартные ошибки среднего значения (m, mp). При осуществлении сравнительного анализа применяли параметрический параметр Стьюдента (t) с определением коэффициента вероятности ошибки (p) и непараметрический критерий Манна–Уитни (U). Для оценки степени взаимосвязи признаков выполнен корреляционный анализ по Спирмену (рассчитывали коэффициент корреляции R). Для подсчета прогностической значимости показателей применяли метод «Латинского квадрата» или четырехпольную таблицу «2x2» [14]. Статистические величины, полученные во всех расчетах, оценивали с помощью соответствующих критериев с пороговым уровнем достоверности не ниже 95% (p=0,05).

Результаты

I этап системы неонатального скрининга.

В табл. 1 представлена клиническая характеристика групп сравнения.

На основании анализа отличий выбранных клинических критериев разработана формализованная система клинико-функциональной оценки степени риска повреждения почек у новорожденных, при этом в качестве повреждающих факторов учитывали следующие: отягощенность анамнеза беременной, степень тяжести гипоксии и медикаментозной нагрузки на плод и новорожденного.

Оценку степени риска развития почечной патологии осуществляли путем суммирования степени весомости каждого фактора. При этом отягощенность анамнеза определяли по шкале Кайнер (шкала оценки оптимальности течения беременности), гипоксию – по КТГ и шкале Апгар, медикаментозную нагрузку – по шкале NTISS. Количество баллов 20–29 по шкале Кайнер оценивали как 0 степень риска возникновения патологии почек, 19 баллов и менее – I степень риска; при оценке КТГ количество баллов, равное 12, оценивали как 0 степень риска, а 8 баллов и менее – I степень; шкала Апгар – количество баллов 8–10 на 1-й минуте оценивали как 0 степень риска, 7–6 баллов – I степень, 5–3 баллов – II степень, 2 балла и менее – III степень риска; шкала NTISS – количество баллов 1–12 оценивали как I степень риска, 13–20 баллов – II степень, 21–30 баллов – III степень, более 30 баллов – IV степень риска. При сложении степеней риска по каждой шкале получали суммарную оценку: от 1 до 8 баллов определяли высокий риск, при 0 баллов – минимальный риск формирования патологии почек у плода. Чем выше суммарная степень риска, тем выше вероятность развития патологии почек. Заметим, что 0 баллов – это минимальный риск, а не отсутствие его. Чувствительность комплексной оценки (Se) равна 100%, специфичность (Sp) – 50% (приоритетная справка на изобретение № 1022501895877).

Предлагаемый способ позволил на основе комплексной оценки повреждающих факторов (гипоксия и медикаментозное воздействие), влияющих на плод и новорожденного, объективно оценить степень риска развития патологии почек, выделить новорожденных с высоким риском развития патологии почек для проведения соответствующей тактики наблюдения за ними.

II этап системы неонатального скрининга.

Исследование роли функциональной активности ТК показало, что мастоциты с различной степенью активности (дегранулирующие и недегранулирующие) встречались во всех анатомических отделах почек (паренхиме, воротах и капсуле). Наибольшей функциональной активностью отли-

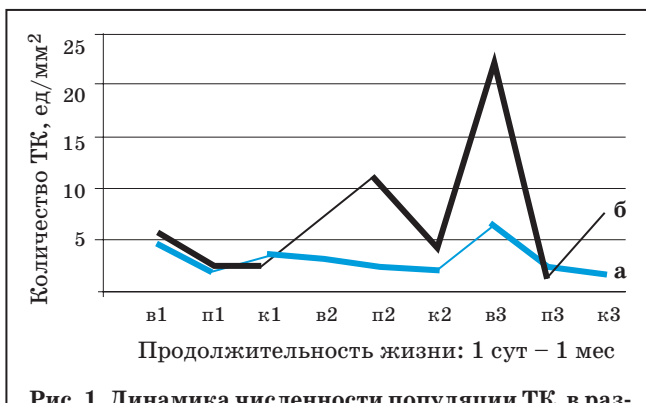


Рис. 1. Динамика численности популяции ТК в разных анатомических отделах почки в зависимости от продолжительности жизни плода.

В – ворота, П – паренхима, К – капсула; 1 – образец почки плода, прожившего менее суток; 2 – образец почки плода, прожившего до 15 суток; 3 – образец почки плода, прожившего более 18 суток; а – без патологии ОМС, б – с патологией почек.

чалась популяция мастоцитов, локализующихся в воротах и паренхиме почек живорожденных плодов, проживших несколько суток (от 2 до 30 суток). В почках мертворожденных плодов популяции ТК были малочисленны и встречались главным образом периваскулярно в воротах и капсуле (от $2,33 \pm 0,58$ до $13,67 \pm 1,15$ /мм² у мертворожденных плодов и новорожденных, проживших менее суток, и от $6,0 \pm 1,0$ до $23,67 \pm 4,04$ /мм² у новорожденных, проживших более суток). В образцах, окрашенных для выявления NADPH-диафоразы, диафоразно-активные клетки встречались редко на фоне «теней» интактных мастоцитов. Выявлена закономерность: увеличение численности популяции ТК в области ворот наиболее выражено в группе плодов женщин с патологией почек и у новорожденных с большей продолжительностью жизни (к 1-му месяцу жизни). При этом в клетках ворот определялись довольно крупные гранулы (ИД равен 0,66–0,82) (рис. 1).

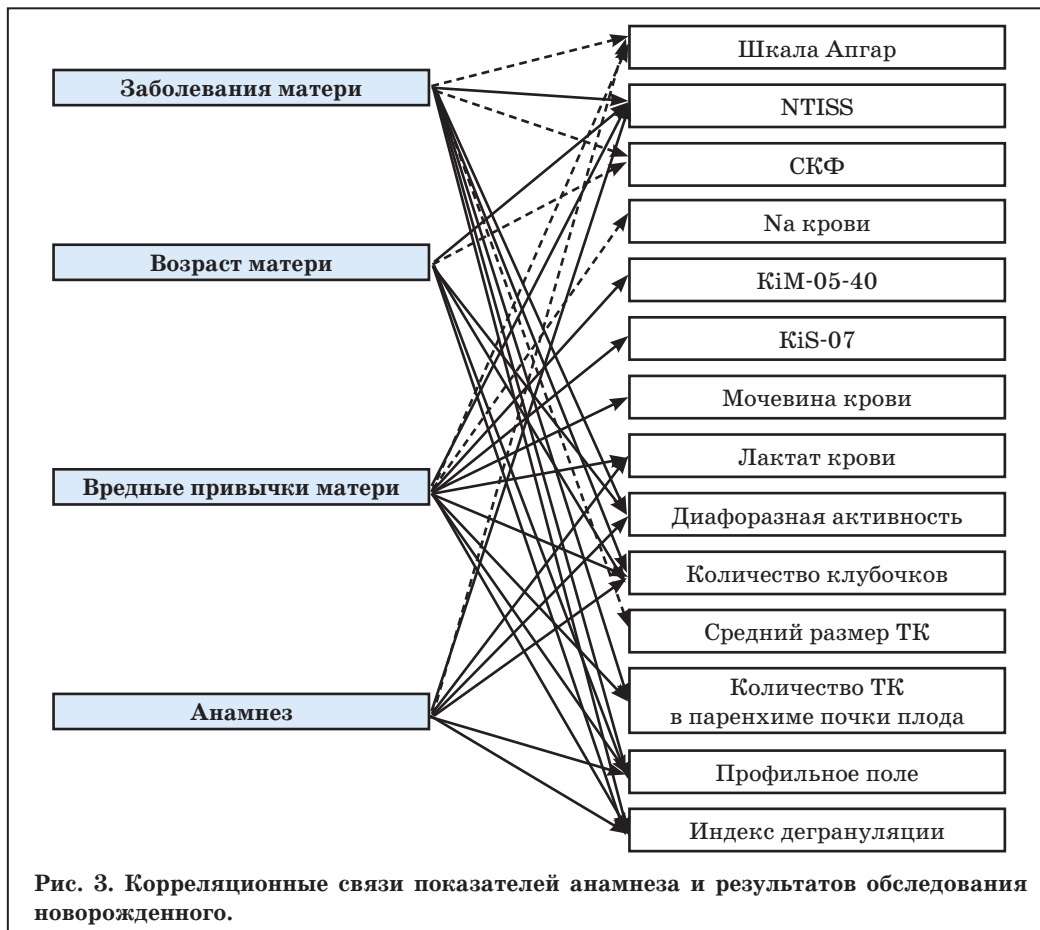
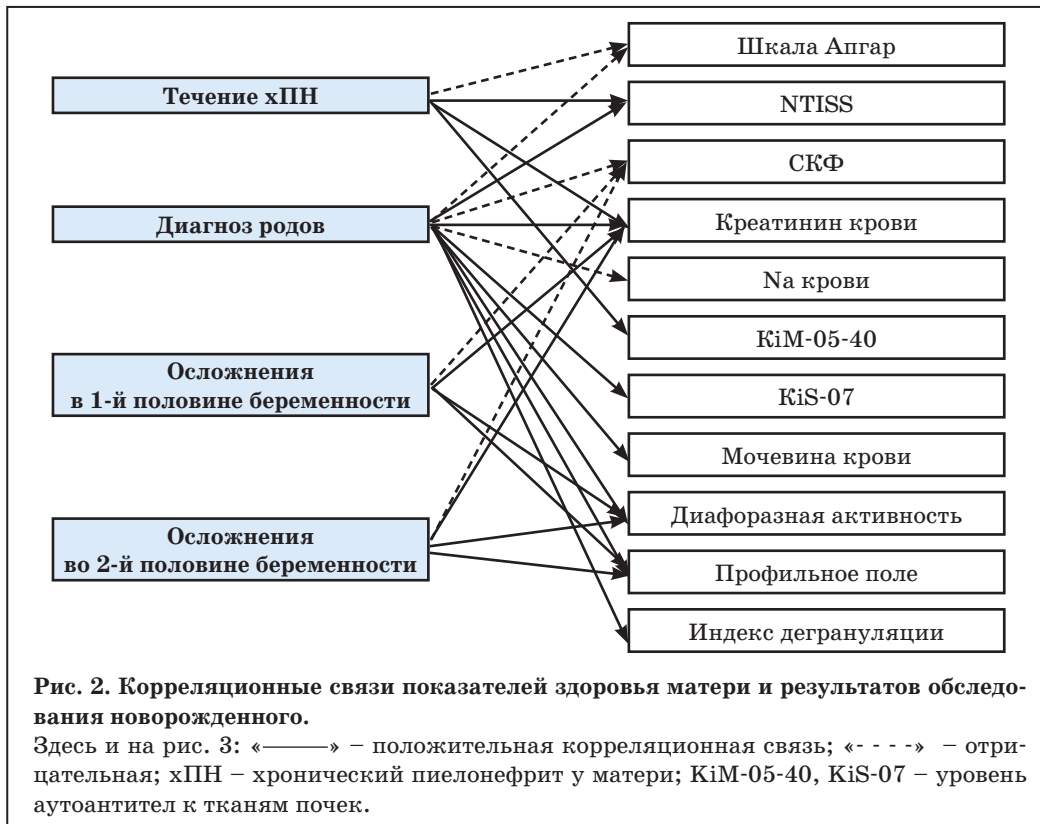
Базофильные гранулоциты крови и ТК являются структурными элементами целостной системы клеток, влияющими на микроциркуляцию и трофику тканей, поэтому их считают регуляторами тканевого гомеостаза. Установлена сильная и умеренная отрицательная корреляционная связь между количеством базофилов в крови и количеством ТК в разных отделах почки: субкапсулярно ($r = -0,75$; $p = 0,04$), в воротах ($r = -0,60$; $p = 0,03$). Это указывает на закономерность миграции периферических базофилов крови в ткани почек и их дифференцировку в зрелые мастоциты. Среднее содержание CD117, 34-положительных ТК в крови составило $47,52 \pm 12,78\%$ в основной группе против $9,07 \pm 5,97\%$ в контрольной ($U = 0,004$, $p < 0,05$). Анализ полученных данных подтвердил гипотезу о том, что предшественники ТК и тканевые мастоциты реагируют на негативное влияние условий, в которых находится плод. Итак, дизэмбриогенез

почки формируется под воздействием главного негативного фактора – гипоксии, и в этом процессе популяция ТК принимает активное участие [9, 15]. Морфологические исследования ТК в ткани почек носят описательный характер, так как не могут быть оценены у пациента при жизни, но их можно использовать в научных исследованиях для изучения патогенетических механизмов формирования патологии почек у новорожденных. Увеличение числа CD117, 34-положительных ТК в крови может использоваться как скрининговый тест с целью определения нарушений тканевого гомеостаза. В дальнейшем все показатели были использованы при статистическом анализе, что позволило выделить наиболее значимые среди них и составить оценочную прогностическую таблицу, включающую изменение характеристик факторов тканевого микроокружения при воздействии перинатальных (патогенетических) факторов риска формирования патологии почек у новорожденных.

III этап системы неонатального скрининга – диагностика гипоксии и нарушений функции почек. Оценка анамнестических и клинических данных группы новорожденных, перенесших асфиксию (основная группа), и здоровых (контрольная) установила, что только в основной группе были новорожденные от курящих женщин (19,3%). У матерей этой группы детей беременность в 8,77% наступала методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и у 47,5% родоразрешение происходило путем кесарева сечения. Дети обеих групп отличались также по физиометрическим и функциональным параметрам, которые в дальнейшем использовались для проведения корреляционной связи с биохимическими показателями в крови и моче. Исследование биохимических параметров в группах сравнения установило значимые различия между большинством из них. Так, разница отмечалась при сравнении значений величины СКФ ($p = 0,001$), лактата крови ($p = 0,012$), МА ($p = 0,053$), карбоангидразы в моче ($p = 0,045$) и Na^+ в крови и моче ($p = 0,011$ и $p = 0,01$ соответственно). У всех детей с очень высокими показателями карбоангидразы мочи (от 240 до 1869 ед/мл) был выставлен диагноз асфиксии тяжелой степени.

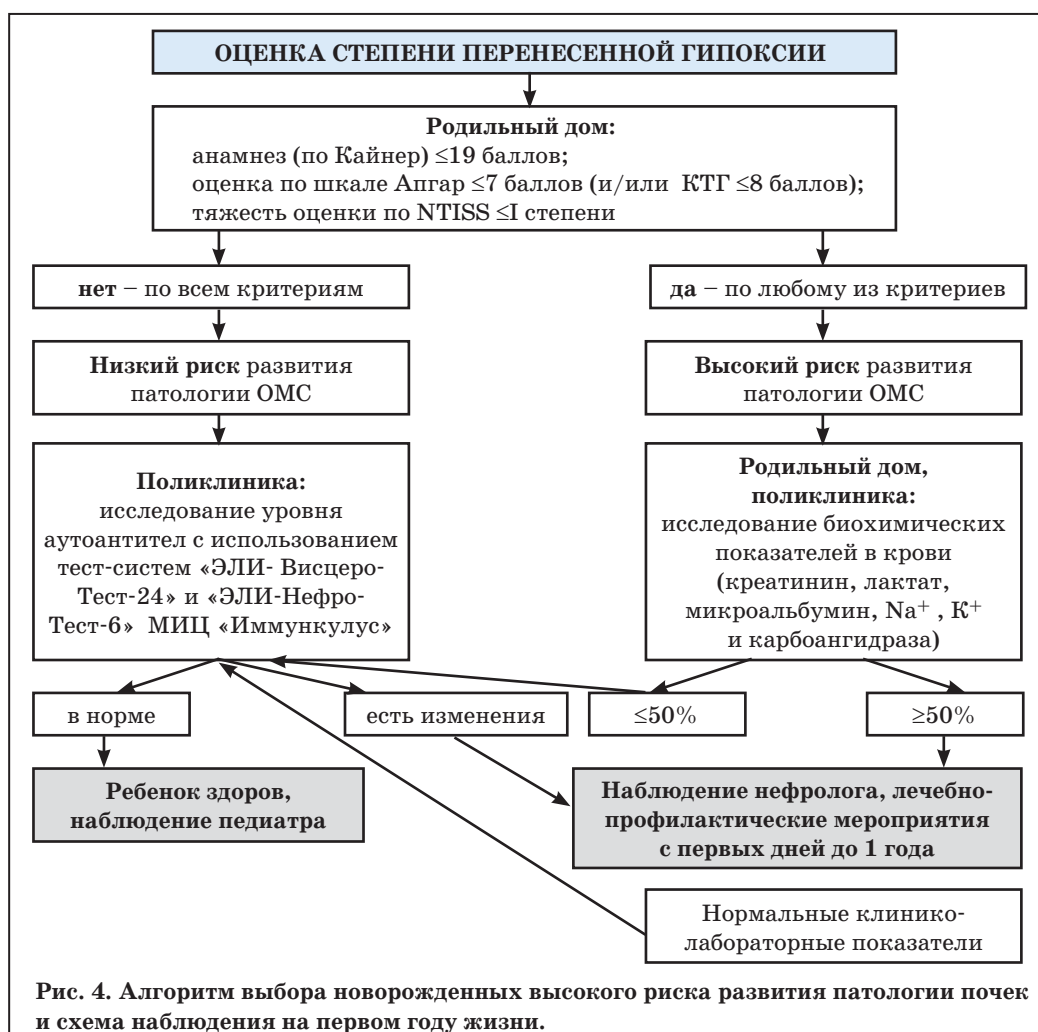
Все показатели с достоверностью $1 < LR+ < 3,5$ были разделены на три уровня специфичности. Первый уровень включал признаки со значением $\text{Sp} \geq 90\%$. Это креатинин крови ($\text{Sp} = 100\%$), креатинин мочи ($\text{Sp} = 100\%$), лактат мочи ($\text{Sp} = 100\%$) и электролиты мочи: Na^+ , K^+ , Cl^- ($\text{Sp} = 100\%$). Во второй уровень со значением $70\% \leq \text{Sp} < 90\%$ вошли следующие признаки: NTISS ($\text{Sp} = 85\%$), Cl^- крови ($\text{Sp} = 76\%$), МА мочи ($\text{Sp} = 84\%$), карбоангидраза мочи ($\text{Sp} = 76\%$). К третьему уровню специфичности отнесены признаки со значением $50\% \leq \text{Sp} < 70\%$. Это анамнез по Кайнер ($\text{Sp} = 56\%$), Na^+ крови ($\text{Sp} = 56\%$), K^+ крови ($\text{Sp} = 64\%$).

Итак, выделены биохимические прогности-



ческие критерии, основанные на принципах научно обоснованной (доказательной) медицинской практики (метод «Латинского квадрата»), кото-

рые необходимо использовать для своевременной диагностики скрытой (без клинических проявлений) патологии ОМС у новорожденных.



IV этап системы неонатального скрининга. Сравнительный анализ показателей уровней естественных аутоантител к антигенам различных органов и систем, в том числе к почечным антигенам, показал значение иммунного импринтинга в формировании патологии почек. Так, в основной группе (дети от матерей с патологией почек) по сравнению с контрольной выявлено больше детей с общей иммунодепрессией и меньше с нормальным уровнем иммунореактивности ($p=0,05$). В то же время детей с повышенным уровнем аутоантител к белкам паренхимы почек достоверно больше встречалось в основной группе (0,24 против 0,17 в контрольной, $p=0,03$). Выявленная закономерность использована в качестве прогностического критерия. На основании показателей аутоиммунитета составлен протокол иммунохимического скрининга для выделения группы риска формирования патологии почек у новорожденных.

Заключительным этапом обоснования системы этапного неонатального скрининга было выявление наличия и силы связи между признаками и событием (наличием/отсутствием заболевания): в нашем исследовании «золотым стандартом» была выбрана ишемическая нефропатия. Для этого использован коэффициент

ранговой корреляции Спирмена (далее S), значение которой вычисляли для каждого признака. Корреляционный анализ факторов риска и клиничко-лабораторных показателей (рис. 2 и 3) в группах сравнения (основной и контрольной) подтвердил значимость влияния состояния здоровья матери, наличия у нее патологии почек, отягощенного течения беременности и осложнения в родах на состояние здоровья ребенка (оценка тяжести состояния по шкалам Кайнер, Апгар, NTISS и изменения биохимических показателей крови и мочи). Корреляции анамнестических данных с морфологическими показателями указывают на открытие новой проблемы, требующей дальнейшего изучения.

Обсуждение

В результате проведенного исследования разработан новый методологический подход прогнозирования развития патологии почек у новорожденных и составлен формализованный алгоритм (рис. 4). Алгоритм представляет собой систему наблюдения за ребенком с первых часов жизни. При наблюдении необходимо исследовать предлагаемые статистически значимые показатели состояния здоровья плода, новорожденного при

рождении в роддоме и ребенка первого года жизни в детской поликлинике, при анализе которых составляются поэтапно персонифицированный прогноз и программа наблюдения с назначением мероприятий первичной профилактики заболеваний почек у детей. К мероприятиям первичной

профилактики можно отнести преконцепционные мероприятия, проведение скринирующих тестов, щадящая терапия интеркуррентных заболеваний, назначение препаратов, улучшающих дозревание морфологических структур органов, контроль за размерами почек в динамике.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Маковецкая Г.А., Козлова Т.В.* К вопросу о болезнях почек у новорожденных и детей первых месяцев жизни. Нефрология и диализ. 2000; 1–2: 51–54.

2. *Папаян А.В., Стяжкина И.С.* Неонатальная нефрология: Руководство. СПб.: Питер, 2000.

3. *Лучанинова В.Н., Бурмистрова Т.И., Транковская Л.В. и др.* Эффективность совместной научной и практической деятельности медицинского университета и службы охраны здоровья матери и ребенка ДЗ ПК в снижении фетоинфантильных потерь в Приморском крае. Тихоокеанский мед. журнал. 2008; 3: 83–87.

4. *Байбарина Е.Н.* Ведение новорожденных с острой почечной недостаточностью. М.: Сфера, 2000.

5. *Fahey J, King TL.* Intrauterine asphyxia: clinical implications for providers of intrapartumcare. J. Midwifery Womens Health. 2005; 50 (6): 498–506.

6. *Чугунова О.Л., Панова Л.Д.* Факторы риска и диагностика заболеваний органов мочевой системы у новорожденных детей. Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. 2010; 1: 12–20.

7. *Haусock GB.* Management of acute and chronic renal failure in newborns. Semin. Neonatol. 2003; 8 (4): 325–334.

8. *Байбарина Е.Н., Зубков В.В., Михайлова О.И.* Состояние

здоровья новорожденных, родившихся у женщин с плацентарной недостаточностью и инфекцией. Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. 2009; 5: 14–19.

9. *Наточин Ю.В.* Развитие почки и проблемы педиатрической нефрологии. Клин. нефрология. 2011; 4: 4–9.

10. *Самсыгина Г.А., Дементьев А.А., Талалаев А.Г.* Клинико-морфологическая характеристика изменений почек у новорожденных, перенесших внутриутробную гипоксию. 1-й Конгресс педиатров-нефрологов. СПб., 1996: 91–92.

11. *Зеленцова В.Л., Шилко В.И., Медведева С.Ю.* Морфологические особенности почек у плодов и новорожденных, перенесших гипоксию. Архив патологии. 2003; 6: 40–44.

12. *Игнатова М.С.* Дизэмбриогенез органов мочевой системы и нефропатии. Клин. нефрология. 2011; 4: 10–15.

13. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica 6.0. М.: МедиаСфера, 2002.

14. *Власов В.В.* Введение в доказательную медицину. М.: Медиа Сфера, 2001.

15. *Козлов В.А., Бусова О.С.* Миграция тучных клеток в почке. Вестн. Чувашского гос. пед. ун-та им. И.Я. Яковлева. 2010; 1: 40–45.