



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Merima Čolić

**URINARNI BIOKEMIJSKI BILJEZI
PREKOMJERNO AKTIVNOG
MOKRAĆNOG MJEHURA U DJECE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Merima Čolić

**URINARNI BIOKEMIJSKI BILJEZI
PREKOMJERNO AKTIVNOG
MOKRAĆNOG MJEHURA U DJECE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Slaven Abdovć
prof. dr. sc. Dunja Rogić

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Merima Čolić

URINARY BIOMARKERS OF OVERACTIVE BLADDER IN CHILDREN

DOCTORAL DISSERTATION

Mentors:

Slaven Abdović, PhD

Professor Dunja Rogić, PhD

Zagreb, 2025

Ovaj doktorski rad napisan je u sklopu Uspostavno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost UIP-2017-05-5379 Uloga urinarnih biomarkera u prekomjerno aktivnom mokraćnom mjehuru u djece koji se pod vodstvom dr.sc. Slavena Abdovića, dr.med. proveo u Klinici za dječje bolesti Zagreb.

Zahvala

Veliko hvala mentoru dr. sc. Slavenu Abdoviću na izboru teme, brojnim savjetima i uvijek novim idejama za daljnja istraživanja i ispitivanja.

Hvala mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić na stručnom vodstvu i spremnim odgovorom na svako postavljeno pitanje.

Hvala doc. dr. sc. Jasni Leniček Krleža i kolegicama na Odjelu za medicinsku biokemiju i hematologiju na svakodnevnom bodrenju i pomoći.

Hvala djelatnicima Ambulante za nefrologiju na svim čajevima, čokoladama i drugim druženjima.

Hvala svim prijateljima koji su znali kad ne pitati kako napreduje rad.

Od srca zahvaljujem roditeljima i sestri na ljubavi i podršci koju su mi oduvijek pružali.

Tata, znam da bi bio ponosan.

Sažetak

Prekomjerno aktivni mokraćni mjehur (OAB, engl. *overactive bladder*) je najčešći poremećaj funkcije mokraćnog mjehura kod djece i vodeći uzrok dnevne intermitentne inkontinencije urina. Dosadašnja istraživanja neinvazivnih biljega OAB-a bila su usmjerena prema neurotrofinima čije su koncentracije bile značajno više kod oboljelih, te su korelirale s težinom kliničke slike. Zbog pretpostavljene uloge upale u patofiziologiji OAB-a, kao mogući biljezi istražuju se i citokini. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi mogu li se omjeri koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu koristiti kao neinvazivni dijagnostički biljezi i kao biljezi praćenja uspješnosti terapije prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura u djece.

U istraživanje je bilo uključeno 48 ispitanika s dijagnosticiranim OAB-om i 48 kontrolnih ispitanika liječenih u Klinici za pedijatriju Klinike za dječje bolesti Zagreb. Kontrolni pregledi ispitanika su se provodili 3 i 6 mjeseci po početku terapije antikolinergicima. Uzorci urina uzimali su se pri subjektivnom osjećaju punog mjehura i potrebe za mokrenjem. Osim uobičajene analize uzoraka urina, u uzorcima urina se analizirala i koncentracija neurotrofina i citokina Luminex imunokemijskom metodom. Koncentracije neurotrofina su se određivale i ELISA metodom.

Nađene su statistički značajno viši omjeri koncentracija IL-1RA, CCL2 i CCL13 i kreatinina u urinu ispitanika s OAB-om prije početka terapije antikolinergicima naspram kontrolnih ispitanika. Statistički je bila značajno niži omjer koncentracije CXCL10 i kreatinina u urinu ispitanika s OAB-om prije započinjanja terapije nego nakon uspješne terapije antikolinergicima.

Ovi rezultati upućuju na mogućnost korištenja navedenih parametara kao dijagnostičkih biljega, odnosno biljega praćenja uspješnosti terapije OAB-a kod djece.

Ključne riječi: Mokraćni mjehur, prekomjerno aktivan; Dijete; Biomarkeri; Urin; Čimbenici rasta živaca; Citokini.

Summary

Introduction

Overactive bladder (OAB) is the most common lower urinary tract disorder in children and the leading cause of intermittent urinary incontinence. The obligatory symptom is urgency, which may be accompanied by frequent urination during the day, daytime intermittent urinary incontinence, enuresis, and nocturia in the absence of a urinary tract infection. Detrusor overactivity in urodynamic studies is common, but not always present. Specific questionnaires such as DVSS (Dysfunctional voiding symptom score) and PIN-Q (Pediatric urinary incontinence quality of life score) are used for standardized data collection. Validated scales such as OABSS and OI are also utilized. When managing patients with OAB, it is important to rule out anatomical or infectious pathology. Diagnosis is often based solely on clinical symptoms, as invasive tests such as urodynamics are challenging to perform in children. The prevalence of OAB is high and negatively impacts the quality of life of the child and their family. The lack of complete understanding of the pathogenesis makes researching this disorder challenging. Normal bladder function depends on complex neural control, including the role of neurotrophins and the potential role of chronic inflammation in the pathogenesis of OAB.

Previous research into non-invasive markers of OAB was focused on neurotrophins. Neurotrophins are crucial trophic factors for neurons, and their influence on bladder cells is mediated by Trk receptors and p75 neurotrophic receptors. Nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are the most researched neurotrophins in the lower urinary tract. They cause detrusor hyperactivity through peripheral and central sensitization, resulting in increased activity of ion channels and neurotransmitter synthesis. Their concentrations were significantly higher in patients and correlated with the severity of the clinical picture.

Due to the presumed role of inflammation in the pathophysiology of OAB, cytokines are also being investigated as possible markers. Some of these cytokines include IL-1 α , IL-1RA, IL-6, CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CXCL1, CXCL8, and CXCL10. Studies have shown increased levels of these cytokines in adults with OAB, proposing them as potential biological markers for diagnosis and monitoring therapy. Further research is needed to understand the role of neurotrophins and cytokines in pediatric OAB and their application as diagnostic and prognostic markers.

The goals of this research were to establish whether the concentrations of neurotrophins and cytokines in urine normalized to creatinine in urine can be used as non-invasive diagnostic markers and as markers for monitoring the success of overactive bladder therapy in children.

Materials and methods

The study included 48 subjects diagnosed with OAB and 48 control subjects recruited at the Pediatric Clinic of the Zagreb Children's Clinic. Urgency was defined as sudden and unexpected experience of an immediate and compelling need to urinate after achieving bladder control and had to be noted more than once per week for at least 3 months. The control subjects had normal micturition behavior and clinical examination with no symptoms or confirmed lower urinary tract disease, no history of urinary tract infection, chronic disease, or urinary tract or genital abnormalities. Informed consent was obtained from the participants and their legal guardians before study procedures. Upon recruitment of participants with OAB and initiation of anticholinergic therapy, all planned medical histories were obtained using a standardized form, clinical status was determined, and symptoms of the disease were examined. Imaging studies (urological ultrasound), functional studies (uroflowmetry), and urodynamic evaluations were performed. The efficacy of the therapy was assessed at 3 months and 6 months post-treatment initiation. Symptom evaluation was conducted during follow-up assessments. Urine laboratory analysis was conducted at three time points: before the start of therapy, at 3 months post-treatment initiation, and at 6 months post-treatment initiation. Urine samples of the subjects and the control subjects were taken at the subjective sensation of a full bladder and the urge to void. In addition to the usual analysis of urine samples, the concentration of neurotrophins and cytokines was also analyzed in the urine samples using the Luminex immunochemical method. Neurotrophin concentrations were also determined by the ELISA method.

Results

Of the 48 recruited patients, 18 had complete success at at least one of the follow-up assessments. The proportion of measurable results of all analytes except IL-1RA, CCL2, CCL13, and CXCL10 was insufficient to carry out statistical analyses of the results. There were statistically significantly higher concentrations of IL-1RA, CCL2 and CCL13 normalized to creatinine in the urine of subjects with OAB before the start of anticholinergic therapy and control subjects. Statistically, there was a significantly

lower concentration of CXCL10 normalized to creatinine in the urine of subjects with OAB before starting therapy than after successful anticholinergic therapy.

Discussion and conclusion

In this research, for part of the analytes, the proportion of samples below the limit of analyte quantification was greater than 30 %, which was not the case in previously published research. When comparing the results, differences in the methodologies used for the analyzes should be taken into account, as well as pre-analytical factors (eg. centrifugation temperature or time from sampling to sample freezing).

In the last few decades, a lot of time and effort has been devoted to researching the role of neurotrophins in the pathophysiology, diagnosis and monitoring of OAB therapy, however, they have not yet been included in the algorithms for the diagnosis or monitoring of OAB therapy. Due to the emergence of a new theory about the role of inflammation in the pathogenesis of OAB, it is to be expected that the scientific community will turn to cytokines as new non-invasive markers of OAB. Because of the suspicion of a different pathogenesis of OAB in children and adults, it is necessary to conduct additional studies of new markers in the pediatric population, as well as longitudinal studies in patients after successful anticholinergic therapy.

Key words: Urinary Bladder, Overactive; Child; Biomarkers; Urine; Nerve Growth Factors; Cytokines.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Mokraćni mjehur	1
1.2 Prekomjerno aktivni mokraćni mjehur	1
1.3 Patogeneza prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura	4
1.4 Neurotrofini	6
1.5 Uloga upale	7
2. Hipoteza i cilj istraživanja	11
3. Materijali, ispitanici, metodologija i plan istraživanja	13
3.1 Ispitanici s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom	13
3.2 Kontrolni ispitanici	14
3.3 Terapija antikolinergicima	14
3.4 Protokol istraživanja	15
3.5 Protokol prikupljanja i obrade uzoraka urina	15
3.6 Statistička analiza	17
3.7 Etička načela	18
4. Rezultati	19
4.1 BDNF	23
4.2 NGF	29
4.3 IL-1 α	32
4.4 IL-1 RA	37
4.5 IL-6	43
4.6 CCL2	45
4.7 CCL7	51
4.8 CCL8	56
4.9 CCL13	61
4.10 CXCL1	67
4.11 CXCL8	72
4.12 CXCL10	77
5. Rasprava	82
5.1 Dijagnostički biljezi	83
5.2 Biljezi praćenja uspješnosti terapije	89
5.3 Nemjerljivi analiti	90
5.4 Predanalitički čimbenici	93
7. Reference	96
8. Popis kratica	106
9. Životopis	109

1. Uvod

1.1 Mokraćni mjehur

Mokraćni mjehur je šuplji organ građen od glatkog mišićja. Sastoji se od trupa u kojem se skuplja mokraća i vrata, ljevkastog produžetka trupa koji prelazi u uretru. Glatki mišić mokraćnog mjehura naziva se detruzor. Prilikom njegove kontrakcije tlak na mjehuru povećava se na 5,3 - 8,0 kPa. Kontrakcija detruzora je ključan korak u pražnjenju mjehura. Mišić u vratu mjehura naziva se unutrašnji sfinkter. On sprječava punjenje vrata i stražnjeg dijela uretre mokraćom i tako onemogućuje pražnjenje mjehura prije nego što tlak u trupu ne dostigne kritični prag. Iza svog stražnjeg dijela, uretra prolazi kroz urogenitalnu dijafragmu u kojoj se nalazi mišićni sloj nazvan vanjski sfinkter mjehura. Taj skeletni mišić je voljno kontroliran te može spriječiti mokrenje čak i kod postojanja signala za pražnjenje mjehura. Mokrenje je proces u kojem se puni mokraćni mjehur prazni. Mjehur se postepeno puni dok napetost njegove stijenke ne postane veća od kritičnog praga. U tom se trenutku javlja živčani refleks - refleks mokrenja. Taj refleks izaziva mokrenje odnosno uzrokuje svjesnu potrebu za mokrenjem (1).

1.2 Prekomjerno aktivni mokraćni mjehur

Prekomjerno aktivni mokraćni mjehur (OAB, engl. *overactive bladder*) definira se kao hitno mokrenje, koje često prati učestalo dnevno mokrenje, te dnevna i noćna intermitentna inkontinencija urina i nokturija (2). OAB je najčešći poremećaj funkcije mokraćnog mjehura i vodeći je uzrok dnevne intermitentne inkontinencije urina, s prevalencijom od 9.18 % za djevojčice i 8.86 % za dječake u dobi od 5 do 14 godina (3). Hiperaktivnost detruzora, pojava povišenih tlakova na stijenci mokraćnog mjehura, je patognomonični nalaz na urodinamici, ali koji se nalazi samo u 50-70 % ispitanika (4, 5). Nadalje, do 50 % pacijenata s dokazanom hiperaktivnošću detruzora neće pokazivati kliničke simptome (6). Urodinamika je invazivna pretraga koja može izazvati nelagodu i bol kod djeteta što otežava suradnju i njeno izvođenje. Samim time, u većini slučajeva dijagnoza prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura se temelji isključivo na kliničkim simptomima i znakovima, što je i aktualna smjernica Međunarodnog društva za dječju kontinenciju (ICCS, engl. *International Children's Continence Society*) (7).

Kako bi se prikupljanje podataka o simptomima standardiziralo, koriste se specifični i validirani upitnici poput Upitnika o simptomima disfunkcijskog mokrenja (DVSS, engl. *Dysfunctional voiding symptom score*) i Upitnika o kvaliteti života djece s inkontinencijom urina (PIN-Q, engl. *Pediatric urinary incontinence quality of life score*) (8, 9). Osim njih, koriste se i validirane skale i matematički indeksi razvijeni s ciljem objektivizacije procjene težine simptoma poput Ocjene simptoma prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura (OABSS, engl. *Overactive bladder symptom score*) i Indeksa hiperaktivnosti (OI, engl. *Overactivity index*) (10, 11).

OABSS upitnik prikazan u tablici 1 se sastoji od četiri pitanja za evaluaciju simptoma OAB-a u - frekvenciju mokrenja, hitnost, nokturiju i dnevnu inkontinenciju. Ukupni rezultat kreće se od 0 do 15 bodova, pri čemu zbroj ukazuje na težinu simptoma (10).

Tablica 1. Upitnik za računanje OABSS indeksa.

Pitanje	Učestalost	Bod
Koji je Vaš prosječan broj mokrenja u danu?	≤ 7	0
	8 - 14	1
	≥ 15	2
Koliko često se noću budite radi mokrenja?	Nijednom	0
	1	1
	2	2
	≥ 3	3
Koliko često se javlja hitnost?	Nema hitnosti	0
	< 1 tjedno	1
	Jednom tjedno ili češće	2
	Jednom dnevno	3
	2 - 4 puta dnevno	4
	≥ 5 puta dnevno	5
Koliko često se javlja inkontinencija?	Nema inkontinencije	0
	< 1 tjedno	1
	Jednom tjedno ili češće	2
	Jednom dnevno	3
	2 - 4 puta dnevno	4
	≥ 5 puta dnevno	5

Ol je razvijen s ciljem izjednačavanja mokrenja i boljeg prikaza volumena mokrenja. On je medijan izmjerenih volumena normaliziranih na 65 % očekivanog kapaciteta mokraćnog mjehura za dob pacijenta. Vrijednosti iznad nule pokazuju da je medijan volumena mokrenja manji od onoga što ICCS definira kao mali mjehur za dob (11).

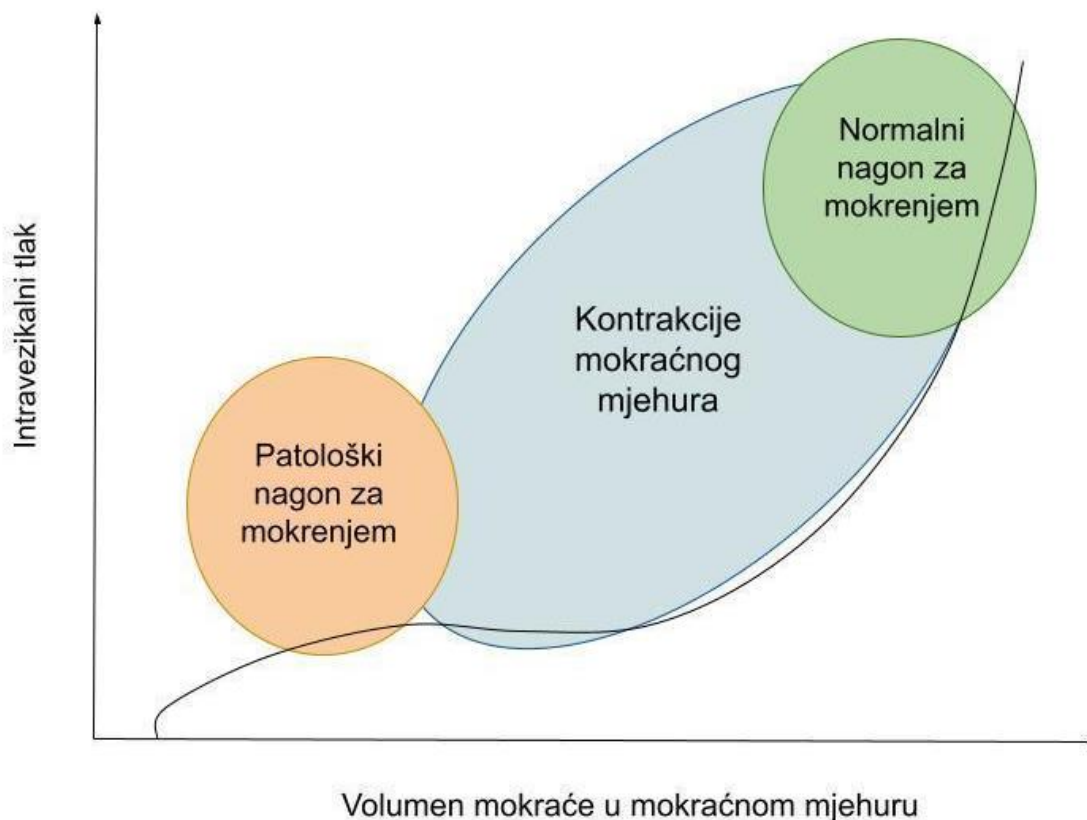
Pri obradi pacijenta sa simptomima OAB-a potrebno je provjeriti prisutnosti anomalija lumbosakralne regije te isključiti akutnu infekciju urotrakta (12). Provjeravaju se ponašanja koja ukazuju na hitnost poput križanja nogu, sjedenja na petama, pritiskanja genitalija, čučanja ili trčanja u kupaonicu (13). Za procjenu poremećaja rada crijeva se koriste kriteriji Rim IV, Bristolska skala stolice i ultrazvučno transabdominalno mjerenje promjera rektuma (14 - 16).

Zbog visoke stope prevalencije, značajan negativni utjecaj na kvalitetu života djeteta i obitelji, veliko godišnje ekonomsko opterećenje i činjenicu da je prekomjerno aktivni mokraćni mjehur u djeteta snažan predisponirajući čimbenik za razvoj urinarnih bolesti u odrasloj dobi, od izrazite je važnosti unapređenje dijagnostičkog pristupa i praćenja učinkovitosti liječenja kod djece (17 - 19).

1.3 Patogeneza prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura

Patogeneza prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura nije u potpunosti razjašnjena. U dječjoj populaciji, smatra se kako disfunkcije donjeg urinarnog trakta primarno nastaju zbog odgođenog ili nepotpunog razvoja kompleksa donjeg urinarnog trakta, koji uključuje mišiće mokraćnog mjehura i sfinktera. Koordinaciju između ovih mišića kontrolira pons, dok korteks regulira inhibiciju refleksa mokrenja i započinjanje voljnog mokrenja (20). Posljedično, nedostatno sazrijevanje korteksa predlaže se kao primarni uzrok pedijatrijskog OAB-a, međutim, ove hipoteze još nisu dokazane (21).

Kontrakcije se obično javljaju kad je mjehur djelomično ispunjen, a nestaju nakon nekoliko sekundi. Kako se mjehur nastavlja puniti, frekvencija refleksa mokrenja postupno raste, a kontrakcija detruzora se pojačava. Pacijenti s OAB-om odstupaju od ove norme i percipiraju te kontrakcije intenzivnijima od normalnih (slika 1) (22).



Slika 1. U bolesnika s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom, patološki nagon za mokrenjem javlja se u početnoj fazi punjenja mokraćnog mjehura zbog sniženog praga osjeta punoće mjehura (modificirano prema: Shim J, Oh MM. Updates of overactive bladder in pediatrics. Int Neurourol J. 2023 Mar;27(1):3-14.)

Normalna funkcija mokraćnog mjehura ovisi o složenoj koordinaciji između različitih neuralnih putanja, uključujući one koje se odnose na senzorne signale i mišićne kontrakcije (23). Živčani sustav, uključujući simpatičke, parasimpatičke i somatske neurone, ima ključnu ulogu u kontroli funkcije mokraćnog mjehura (24). Aferentni signali iz donjeg urinarnog trakta obavještavaju mozak o punjenju mokraćnog mjehura, što onda rezultira kontrakcijama mokraćnog mjehura (25). Muskarinski receptori, posebno podtip M3, i neurotransmiter acetilkolin ključni su za kontrahiranje mokraćnog mjehura (26, 27).

Istraživanja u posljednjem desetljeću ukazuju na značajnu ulogu neurotrofina u mehanizmima ispoljenja OAB-a (28). Osim toga, novije studije ukazuju na potencijalnu ulogu kronične upale u patogenezi OAB-a, čime se otvaraju nova područja istraživanja. Kao potencijalni urinarni biokemijski biljezi istražuju se brojni citokini.

1.4 Neurotrofini

Neurotrofini pripadaju velikoj obitelji trofičkih čimbenika ključnih za preživljenje neurona, i uspostavljanje, održavanje i regulaciju sinapsi. Učinci neurotrofina na stanice su posredovani receptorima iz dvije klase: Trk receptorima i p75 neurotrofinskim receptorima. Oba tipa receptora su transmembranski glikoproteini te se nalaze u visokim koncentracijama na stanicama mokraćnog mjehura. Djelovanje putem Trk receptora je obično poticajno za preživljavanje i rast stanica, dok djelovanje putem p75 receptora može inducirati apoptozu (29). Najistraživaniji predstavnici neurotrofina u poremećajima donjeg urotakta su živčani čimbenik rasta (NGF, engl. *nerve growth factor*) i moždani neurotrofni čimbenik (BDNF, engl. *brain-derived neurotrophic factor*). Neurotrofini se oslobađaju u velikim koncentracijama iz urotela, mastocita i glatkih mišićnih stanica mjehura kao reakcija na rastezanje ili upalu mjehura. Oslobodeni NGF se veže na aferentna C-vlakna i senzitivizira aferentne putove mokrenja u mjehuru (30). Kod zdravih osoba, urinarni NGF fiziološki raste kod poriva za mokrenjem, međutim, u pacijenata s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom je patološki povišen već pri malim volumenima punjenja mjehura što rezultira hitnošću i učestalim dnevnim mokrenjem (31).

U eksperimentalnim animalnim modelima, hiperaktivnost detruzora postignuta je aplikacijom NGF-a u mokraćni mjehur (32). To je posredovano perifernom i centralnom preosjetljivošću koja je obilježena pojačanom aktivnošću ionskih kanala i povišenom sintezom ekscitatornih neuromedijatora (29, 30, 33). Hiperaktivnost detruzora je isto dobivena tijekom kontinuirane aplikacije NGF-a u intratekalni prostor na lumbosakralnoj razini (34). Povećana ekspresija NGF-a u "NGF-overexpressing" transgeničnog miša rezultirala je smanjenim kapacitetom mokraćnog mjehura, porastom broja i amplitude nevoljnih kontrakcija mjehura te somatskom hipersenzitivnošću zdjelčnih snopova živčanih vlakana koja je obilježena njihovom hiperplazijom (35).

Na modelu štakora, istraživači su otkrili kako je nakon injekcije ciklofosfamida urotel mokraćnog mjehura područje primarne prekomjerne ekspresije BDNF-a (36). Prekomjerna ekspresija također je primijećena u urotelu bolesnika s rakom mjehura (37). Smatra se da povećana ekspresija izravno uzrokuje povišene razine BDNF-a u urinu pacijenata s OAB-om (38, 39). Mjesto djelovanja BDNF-a nije ograničeno na mjesto ekspresije zbog njegove parakrine prirode i sposobnosti neurotrofina da

difundiraju u vezivno tkivo na udaljenosti do otprilike 3 mm (24, 40). Osim toga, BDNF iz dubljih slojeva tkiva također može dospjeti u urin putem intersticijske difuzije (41) preko tankog tkiva stijenke mjehura (42). Na animalnom modelu je pokazano kako prekomjerna ekspresija BDNF-a može uzrokovati genomske promjene u aferentnim i eferentnim neuronima mokraćnog mjehura, koji su kritični u ispoljavanju simptoma OAB (43).

Nekoliko kliničkih istraživanja na odraslim ispitanicima s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom zabilježile su statistički značajno povišenu koncentraciju urinarnog NGF-a i BDNF-a u usporedbi sa zdravim ispitanicima (29). Koncentracija NGF-a u urinu proporcionalno je korelirala s težinom kliničke slike (44, 45). Nakon uspješnog liječenja antikolinergicima, koncentracija NGF-a bila je značajno snižena kod odraslih (4, 44, 46, 47). Do sada je provedeno i nekoliko istraživanja o koncentracijama neurotrofina u urinu u pedijatrijskoj populaciji, a ta su istraživanja pokazala slične rezultate kao na odraslima (48 - 52). Međutim, visoka koncentracija urinarnog NGF-a ostala je povišena kod pacijenata koji su nisu reagirali na terapiju antikolinergikom, vjerojatno zbog prisutnosti kronične upale stijenke mjehura (53). Navedena istraživanja su koristila ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kao metodu detekcije neurotrofina. Oprečno navedenim istraživanjima, Lin i suradnici, 2020. nisu detektirali mjerljivu koncentraciju NGF-a ELISA metodom u urinu pacijenata s OAB-om (54). Ta studija ukazuje na to kako je potrebno ispitati više metoda kako bi se uspostavila najbolja praksa za detekciju biokemijskih biljega u urinu.

Metaanaliza o istraživanju korištenja koncentracije urinarnog NGF-a kao biokemijskog biljega prekomjerno aktivnog detruzora iz 2019. navodi kako on jest potencijalni neinvazivni biljeg, no ističe kako su potrebna dodatna klinička istraživanja kako bi se ta pretpostavka potvrdila (55).

1.5 Uloga upale

Do sada je provedeno nekoliko istraživanja u kojima se ispitala moguća uloga upale u patogenezi OAB-a. Simptomi upale mokraćnog mjehura poput hitnog mokrenja, učestalog dnevnog mokrenja i nokturije posljedica su mehanizama borbe protiv patogena gdje domaćin jednosmjernim protokom urina, te čestim i potpunim pražnjenjem mokraćnog mjehura postiže sterilnost mokraćnih puteva (56). Međutim, ti se simptomi preklapaju s onima OAB-a, te je pitanje je li i u tom slučaju prisutna sterilna

upala. U istraživanju u kojem su pacijentima s OAB-om izvođene biopsije mokraćnog mjehura, utvrđena je prisutnost kronične upale (57).

Citokini, proteini s raznim protuupalnim i proupalnim učincima, biljezi su od interesa upalnih promjena u organizmu (58).

Interleukin 1 α (IL-1 α) je proupalni citokin koji vezanjem na receptor interleukina-1 (IL-1R, engl. *interleukin-1 receptor*) aktivira ključne transkripcijske faktore povezane s upalnim i imunosnim odgovorom. Posljedična signalna kaskada vodi do ekspresije brojnih medijatora koji zajedno uzrokuju upalni odgovor kroz sintezu citokina, kemokina, interferona i prostaglandina, vazodilataciju, ekspresiju adhezijskih molekula na endotelnim stanicama, aktivaciju T-pomagačkih limfocita te sazrijevanje i klonalnu ekspanziju B limfocita (59). Prekursor IL-1 α je prisutan u svim zdravim tkivima mezenhimskog podrijetla, posebno stanicama tkiva s funkcijom barijere poput epitelne stanice tipa 2 u plućima, epitela gastrointestinalnog trakta, endotelne stanice u krvnim žilama i astrocitu u mozgu. Proizvodnja prekursora IL-1 α je za vrijeme upale inducirana i u mijeloidnim stanicama (60).

Antagonist na receptor interleukina 1 (IL-1RA, engl. *interleukin-1 receptor antagonist*) je citokin koji se veže na IL-1R, no ne uzrokuje upalni odgovor. Na taj način sprječava proupalno djelovanje IL-1 α i interleukina 1 β (IL-1 β) (61).

Interleukin 6 (IL-6) citokin je višestrukih uloga u upali i imunosnom odgovoru. Potiče sintezu proteina akutne faze poput C-reaktivnog proteina (CRP), serum amiloida A, alfa 1-antitripsina, fibrinogena i hepcidina, te stimulira stvaranje antitijela i razvoj efektornih T-stanica (62). Kao odgovor na razne podražaje, luče ga monociti/makrofagi, T-stanice, B-stanice, endotelne stanice, glatke mišićne stanice, fibroblasti i drugi tipovi stanica (63).

CC kemokin ligand 2 (CCL2), poznat i kao monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1, engl. *monocyte chemoattractant protein-1*), jedan je od najvažnijih kemokina u regulaciji migracije i infiltracije monocita. Proizvode ga mnoge vrste stanica, uključujući endotelne, fibroblastične, epitelne, glatke mišićne stanice, mezangijske, astrocitne, monocitne i mikroglijalne stanice (64).

CC kemokin ligand 7 (CCL7), prethodno znan kao monocitni kemotaktični protein 3 (MCP-3, engl. *monocyte chemoattractant protein-3*), je kemotaktički faktor za neutrofilne granulocite i monocite. Izlučuje se iz endotelne stanice, vaskularnih glatkih mišićnih stanica i mijelomonocitnih stanica. Novije studije ispituju ulogu CCL7 u

različitim bolestima bubrega, uključujući glomerulonefritis, bubrežne kamence, ozljedu bubrega i završni stadij bolesti bubrega (65).

CC kemokin ligand 8 (CCL8), znan i kao monocitni kemotaktični protein 2 (MCP-2, engl. *monocyte chemoattractant protein-2*), kemokin je koji aktivira monocite, T-limfocite, NK-stanice, eozinofile, bazofile i mast stanice. Njegovo izlučivanje iz mononuklearnih stanica i fibroblasta je inducirano djelovanjem proupalnih proteina IL-1 β , interferona- γ (IFN- γ), faktora nekroze tumora- α (TNF- α , engl. *tumor necrosis factor- α*) i drugih čimbenika (66).

CC kemokin ligand 13 (CCL13), odnosno monocitni kemotaktični protein 4 (MCP-4, engl. *monocyte chemoattractant protein-4*), svoj kemotaktički učinak vrši nad monocitima, T-stanicama, eozinofilima i nezrelim dendritičnim stanicama. Osim toga, uzrokuje lučenje proupalnih citokina iz endotelnih, epitelnih i mišićnih stanica (67). Čini se da bi CCL13 mogao igrati ključnu ulogu u dovođenju i zadržavanju makrofaga u upali bubrega (68).

CXC kemokin ligand 1 (CXCL1), poznat i kao onkogen-alfa reguliran rastom (GRO- α , engl. *growth regulated oncogene- α*), kemoatraktant je prvenstveno neutrofilnih granulocita (69). Njegova ekspresija povećava se djelovanjem nuklearnog faktora κ B (NF- κ B) kojeg aktiviraju proupalni citokini IL-1 β i TNF- α (70). CXCL1 ispituje se kao potencijalni biljeg raka mokraćnog mjehura (71).

CXC kemokin ligand 8 (CXCL8), poznatiji pod imenom interleukin 8 (IL-8), najpotentniji je kemoatraktant neutrofilnih granulocita. Luče ga monociti, makrofagi, T-limfociti, endotelne stanice, epitelne stanice, fibroblasti i drugi tipovi stanica (72). Uloga koju CXCL8 igra u upalnim procesima povezuje se s mnogim bolestima, uključujući infektivne bolesti crijeva poput ulceroznog kolitisa, i brojne bolesti bubrega poput glomerulonefritisa, nefrotskog sindroma, nefropatije i raka bubrega (72, 73).

CXC kemokin ligand 10 (CXCL10), prije znan kao protein 10 inducibilan interferonom- γ (IP-10, engl. *interferon- γ -inducible protein 10*), kemokin je s utjecajem na migraciju Th1 limfocita, a osim njih kemoatraktant je i za monocite, T limfocite i NK stanice. Luče ga monociti, aktivirani neutrofilni granulociti, epitelne stanice, endotelne stanice i drugi tipovi stanica pod utjecajem IFN- γ (74).

Do sada je provedeno nekoliko istraživanja s fokusom na citokine, odnosno kemokine kao potencijalne biljege OAB-a. Ispitivane su serumske koncentracije upalnih parametara odraslih s OAB-om i pokazano je kako su CRP, NGF, IL-1 β , IL-6, CXCL8, CCL2 i TNF- α bili viših koncentracija u ispitanika s OAB-om u odnosu na kontrolne

ispitanike (75). Istraživanje iz 2019. pokazalo je kako je CCL2 viši u urinu odraslih žena s OAB-om u odnosu na kontrolnu skupinu (76). U pilot studiji u kojoj je ispitana koncentracija 120 proteina u uzorcima urina odraslih žena s OAB-om, odraslih žena s urinarnom infekcijom te kontrolnoj skupini, CCL2 imao je statistički značajno višu koncentraciju u skupini OAB u odnosu na druge dvije, a među proteinima viših u odnosu na kontrolnu skupinu bili su i CCL7 i CCL8 (77). Također je zanimljiva i različita razina ekspresije proupalnih kemokina CXCL1, CXCL8 i CXCL10 između ispitanika s urinarnom infekcijom i OAB-om što ukazuju na postojanje različitih puteva upale među njima. Ulogu upale potvrđuje i različita koncentracija IL-1RA između ispitanika s OAB-om i kontrolne skupine (78).

Kao i za neurotrofine, istraživanja o citokinima i kemokinima navode potrebu za dodatnim istraživanjima na većim kohortama, kao i istraživanjima u kojima će se pratiti promjene u koncentracijama proteina prema uspješnosti terapije.

Bitno je naglasiti kako do svibnja 2025. nisu objavljena istraživanja o koncentraciji citokina u populaciji djece s OAB-om.

Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se:

1. utvrdila koncentracija urinarnih neurotrofina i citokina kod zdrave djece;
2. utvrdila značajnost neurotrofina i citokina kao učinkovitih i neinvazivnih urinarnih biokemijskih biljega u dijagnostici prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura kod djece;
3. utvrdila značajnost neurotrofina i citokina u praćenju učinkovitosti liječenja djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom antikolinergičnom terapijom;
4. utvrdila povezanost između koncentracija neurotrofina i citokina kod akutne bolesti s nalazom urodinamike i kliničkim mjerama ishoda.

U ovom istraživanju, analizirat će se koncentracije neurotrofina NGF i BDNF, te citokina IL-1 α , IL-1RA i IL-6, CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CXCL1, CXCL8 i CXCL10.

2. Hipoteza i cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su ustvrditi mogu li se omjeri koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu koristiti kao neinvazivni dijagnostički biljezi i kao biljezi praćenja uspješnosti terapije prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura u djece.

Specifični ciljevi su:

1. Imunokemijskom metodom odrediti koncentraciju neurotrofina i citokina u urinu pacijenata s dijagnosticiranim OAB-om prije početka terapije antikolinergicima
2. Imunokemijskom metodom odrediti koncentraciju neurotrofina i citokina u urinu pacijenata s dijagnosticiranim OAB-om 3 i 6 mjeseci po početku terapije antikolinergicima
3. Imunokemijskom metodom odrediti koncentraciju neurotrofina i citokina u urinu kontrolnih ispitanika
4. Analizirati razliku u omjeru koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu između ispitanika s dijagnosticiranim OAB-om prije početka terapije i kontrolne skupine
5. Analizirati razliku u omjeru koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu između ispitanika s dijagnosticiranim OAB-om prije početka i nakon uspješne terapije antikolinergicima
6. Utvrditi povezanost omjera koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i drugih varijabli značajnih u dijagnostici i praćenju uspješnosti terapije prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura kod djece
7. Utvrditi dijagnostičku točnost za OAB: specifičnost, osjetljivost, te negativne i pozitivne prediktivne vrijednosti omjera koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu

Istraživanje ima dvije hipoteze:

Omjer koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu je statistički značajno viši u urinu djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom u usporedbi s djecom bez prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura.

Omjer koncentracije neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu je statistički značajno niži u urinu djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom nakon uspješno

provedene terapije antikolinergicima u usporedbi s početnim koncentracijama tijekom akutne faze bolesti.

3. Materijali, ispitanici, metodologija i plan istraživanja

3.1 Ispitanici s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom

Prijašnje istraživanje (50) je prijavilo veličinu učinka od male do srednje veličine (Cohen's d) za longitudinalna mjerenja biljega OAB-a tijekom 3 i 6 mjeseci. Na temelju srednje vrijednosti njihovih veličina efekta, može se očekivati $d=0,48$ (srednja veličina efekta) za drugu hipotezu (longitudinalni dio istraživanja). Za $\alpha=0,05$, $\beta=0,80$, dvostranu usporedbu i $d=0,48$ potrebno je 37 ispitanika u slučaju normalne distribucije varijable i 38 ispitanika u slučaju nenormalne distribucije varijable.

Analiza stope osipanja u pedijatrijskim istraživanjima pokazuje kako se ona kreće od 20 % za prvu i 32 % za sljedeću kontrolnu točku (79). Uzevši to u obzir, izabrana je konzervativna procjena o stopi od 25 % osipa ispitanika te se time kao broj ispitanika u početnoj točki dobije 48. S $N=48$, $\alpha=0,05$ i $\beta=0,8$, može se detektirati $d > 0,57$ za normalnu i $> 0,59$ za nenormalnu distribuciju što označava srednju do veliku veličinu efekta koji je u skladu s dosadašnjom literaturom. Istraživanje je za hipotezu 1 uključilo jednak broj kontrolnih ispitanika.

Skupini ispitanika i kontrolnih ispitanika ovog prospektivnog intervencijskog istraživanja pripadaju pacijenti Klinike za dječje bolesti Zagreb.

Ispitanici su liječeni u ambulanti Odsjeka za nefrologiju Klinike za pedijatriju u periodu od veljače 2020. do studenog 2021. godine. Ispitanici su bila djeca u dobi od 3 do 17 godina sa simptomima poremećaja pohrane urina: obavezni simptom je hitnost, dok su dodatni mogući simptomi učestalo dnevno mokrenje, intermitentna inkontinencija i nokturija. Hitnost je definirana kao nagli i neočekivani osjet trenutačnog i nezaustavljivog nagona za mokrenjem koji je nastao nakon postizanja kontrole nad mokrenjem, tj. odvikavanja od pelena, a koji se primijetio više od jednom tjedno kroz prethodna 3 mjeseca. Isključujući kriteriji su bili akutna infekcija urotrakta, više od tri potvrđene uroinfekcije u periodu od 3 mjeseca prije regrutacije, bolesti središnjeg ili perifernog živčanog sustava, anomalije lumbosakralne regije, infravezikalna opstrukcija, prethodni operativni zahvati i anomalije donjeg urotrakta ili spolnog sustava, hiperkalciurija, dijabetes mellitus, dijabetes insipidus, primarna monosimptomatska enureza, neurogeni mjehur i terapija antikolinergicima u periodu od 6 mjeseci prije ispitivanja.

Početna procjena ispitanika uključivala je uzimanje anamneze, utvrđivanje kliničkog statusa, ispunjavanje 48-satnog dnevnika pijenja i mokrenja, ultrazvuk urotrakta, mikciometriju s utvrđivanjem rezidualnog volumena urina, kompletan urin i urinokulturu. Prije početka istraživanja, ispitanici s konstipacijom su tretirani osmotskim laksativima, bihevioralnim modifikacijama i promjenama prehrane. Svi ispitanici su započeli standardnu uroterapiju koja je uključivala informacije o OAB-u i bihevioralne modifikacije (redovito mokrenje, optimalan položaj pri mokrenju, primjeren dnevni unos tekućine koji je ravnomjerno raspoređen i izbjegavanje pića koji potiču mokrenje).

Urodinamika je preporučena svim pacijentima koji su prije početka terapije antikolinergicima, a nakon minimalno mjesec dana standardne uroterapije, i dalje imali hitnost. Urodinamika je provedena prema smjernicama ICCS i pravilima dobre prakse. Kontrolni pregledi su se provodili 3 i 6 mjeseci po početku terapije, a na njima se odgovor na terapiju procjenjivao prema ICCS klasifikaciji (2). Pacijenti čiji su se simptomi smanjili za 100 % su definirani kao kompletan uspjeh, pacijenti s redukcijom simptoma 50-99 % su definirani kao parcijalni uspjeh, a pacijenti sa smanjenjem simptoma manjim od 50 % su definirani kao nereagirajući.

3.2 Kontrolni ispitanici

Skupinu kontrolnih ispitanika činili su pacijenti Klinike za pedijatriju Klinike za dječje bolesti Zagreb. Te ispitanike činila su djeca u dobi od 6 do 17 godina s normalnim obrascem mokrenja i urednim kliničkim statusom bez simptoma ili potvrđenih bolesti donjeg urotrakta, bez povijesti infekcije urotrakta, kronične bolesti ili anomalija mokraćnog ili spolnog sustava. Osim navedenih uvjeta, isključujući kriterij bili su bolesti središnjeg ili perifernog živčanog sustava, korištenje antikolinergika u prethodnih 6 mjeseci, te funkcionalne bolesti crijeva. Ispitanicima su se uzeli podatci o prisutnosti nokturije, volumenu tekućine koji prosječno unose po danu i o trenutačno korištenoj terapiji.

3.3 Terapija antikolinergicima

Po postavljanju dijagnoze idiopatskog prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura, a na temelju postojećih smjernica, započela je terapija antikolinergicima. Standardna uroterapija je nastavljena u svih pacijenata za vrijeme terapije antikolinergicima.

3.4 Protokol istraživanja

Pri uključanju ispitanika s OAB-om i prije početka terapije antikolinergikom, uzeli su se svi planirani anamnestički podatci uporabom standardiziranog formulara te utvrdio klinički status i ispitali simptomi bolesti. Napravile su se slikovne pretrage (ultrazvuk urotrakta), funkcijske pretrage (mikciometrija) i urodinamika. Procjena učinkovitosti terapije provodila se 3 mjeseca po početku terapije i 6 mjeseci po početku terapije. Na kontrolnim procjenama ispitali su se simptomi bolesti. Laboratorijska analiza urina provodila se u 3 navrata: prije početka terapije, 3 mjeseca po početku terapije i 6 mjeseci po početku terapije.

3.5 Protokol prikupljanja i obrade uzoraka urina

Uzorci urina ispitanika (tri točke prikupljanja uzorka) i kontrolnih ispitanika (jedna točka prikupljanja uzorka) uzimali su se pri subjektivnom osjećaju punog mjehura i potrebe za mokrenjem. U slučaju provođenja postupka urodinamike, uzorak urina se uzeo nakon postavljanja katetera prije faze punjenja mokraćnog mjehura. Uzorci urina prikupljali su se na sobnoj temperaturi. Alikvot od 10 ml urina je unutar 30 min od prikupljanja centrifugiran 10 min na 3000 g pri sobnoj temperaturi. Pet alikvota supernatanta volumena 1,5 ml zamrznuti su i pohranjeni na -80 °C do analize koncentracije neurotrofina i citokina. U ostatku uzorka urina učinjene su preostale standardne laboratorijske pretrage.

Koncentracije kreatinina, ukupnih proteina, kalcija, natrija, kalija i klorida u urinu izmjerene su na automatskom analizatoru Olympus AU680 (Beckman Coulter, Brea, SAD). Kvalitativna analiza urina i sedimenta urina se napravila na automatskom sustavu iRICELL (Beckman Coulter, Brea, SAD). Urinokultura se odradila na CPSE podlozi (bioMérieux SA, Francuska). Određivanje koncentracija BDNF i NGF provela se ELISA metodom (Merck, Darmstadt, Germany) i Luminex metodom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) prema uputama proizvođača.

ELISA je imunokemijska metoda na pločici za kvantitativno određivanje ciljnih proteina u biološkim uzorcima. ELISA testovi korišteni u ovom istraživanju su tzv. sendvič testovi u kojima su pločice s 96 jažica obložene specifičnim antitijelom za analit od interesa. Prema protokolu proizvođača, za vrijeme inkubacije standarda poznate koncentracije i uzoraka, ciljni proteini vezao se na mobilizirana antitijela. U jažice se nakon ispiranja potom dodalo biotinilirano antitijelo specifično za ciljni protein. Nakon

ispiranja nevezanog biotinitiranog antitijela, dodao se streptavidin konjugiran s peroksidazom iz hrena. Jažice su se ponovno isprale, a potom se dodala otopina supstrata tetrametil benzidina čija se boja zbog djelovanja peroksidaze razvila proporcionalno količini vezanog ciljnog proteina. Stop otopina promijenila je boju iz plave u žutu, a intenzitet boje se izmjerio spektrofotometrijski na valnoj duljini $\lambda=450$ nm. Koncentracija ciljnog proteina u uzorcima izračunava se iz standardne krivulje dobivene iz poznatih koncentracija i apsorbancije dobivene iz korištenih standardnih otopina.

Detekcijski raspon za određivanje koncentracije BDNF-a je bio 0,07 - 16 ng/mL, a za NGF-a 6,86 - 5000 pg/mL. Kontrola kvalitete nije provedena tijekom ispitivanja analita. Analize su obavljene unutar dvije godine od prikupljanja uzorka. Stabilnost proteina nije ispitana prije analize. Koncentracije BDNF i NGF analizirane su ELISA metodama istovremeno iz istog alikvota.

Luminex metoda je imunokemijska metoda koja kombinira ELISA metodu s protočnom citometrijom. Omogućava istovremenu kvantitativnu analizu više analita u malom volumenu biološkog uzorka. U analizi se koriste magnetizirane kuglice koje su obojane graduiranom mješavinom fluorescentnih boja. Varijacije sastojaka mješavina unutarnjeg obojenja kuglica proizvode stotine različitih profila fluorescencije koji omogućuju pojedinačno ispitivanje i klasificiranje u jednom uzorku. Mikrokuglice jednog identiteta konjugirane su na površini specifičnim antitijelom za vezanje pojedinog proteina od interesa. Prema protokolu proizvođača, mješavina kuglica pipetirana je u pločicu s 96 jažica. Nakon inkubacije standardinih otopina i uzoraka, jažice su isprane i dodan koktel biotinitiranih antitijela specifičnih za ciljne proteine. Nakon ispiranja nevezanih biotinitiranih protutijela, u jažice je dodan streptavidin konjugiran s fikoeritrinom. Nakon još jednog ispiranja, kompleks mikrokuglica i proteina od interesa analiziran je prolaskom kroz protočnu komoru opremljenu ekscitacijskim laserima i elektroničkim uređajem za mjerenje intenziteta fluorescencije kompleksa kuglice i ciljnog proteina. Proteini su se međusobno razlikovali po boji samih kuglica, a kvantificirani su mjerenjem intenziteta fluorescencije antitijela za otkrivanje konjugiranog na reportersku boju. Analize su obavljene unutar dvije godine od prikupljanja uzorka. Koncentracije svih proteina od interesa analizirane su istovremeno iz istog alikvota.

Detekcijski rasponi za pojedine analite Luminex metodom bili su:

BDNF 1,33 - 5450 pg/mL

NGF 7,35 - 30100 pg/mL
IL-1 α 0,79 - 3250 pg/mL
IL-1RA 160,25 - 164100 pg/mL
IL-6 12,89 - 52800 pg/mL
CCL2 4,22 - 17300 pg/mL
CCL7 3,39 - 13900 pg/mL
CCL8 0,43 - 1750 pg/mL
CCL13 0,85 - 3500 pg/mL
CXCL1 2,22 - 9100 pg/mL
CXCL8 2,54 - 10400 pg/mL
CXCL10 2,08 - 8500 pg/mL

3.6 Statistička analiza

Kolmogorov-Smirnov testom testirala se hipoteza normalne distribucije kvantitativnih varijabli. Ukoliko je p vrijednost $> 0,05$, pretpostavilo se kako podatci imaju normalnu razdiobu, a ako je $p < 0,05$, pretpostavilo se kako razdioba nije normalna. Budući da nisu sve varijable pokazale normalnu distribuciju, rezultati svih su se prikazale kao medijan (interkvartilni raspon).

Omjeri koncentracije analita i kreatinina u uzorcima mokraće ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazane su u grafikonu okvira s ručicama (engl. *box plot*). Vrijednosti koje odstupaju uklonjene su iz grafičkog prikaza prema Tukeyu.

U slučaju nemogućnosti kvantifikacije koncentracija, rezultati su pretvoreni u kategorijske varijable koje su bile ispod ili iznad limita kvantifikacije pojedinog analita. Razlike između kategorijskih varijabli su određene koristeći Fisherov test u usporedbi udjela kvantificiranih rezultata između ispitanika i kontrolnih ispitanika, te McNemarovim testom između ispitanika prije početka terapije i nakon uspješne terapije.

Ukoliko nije bilo statistički značajne razlike u udjelu kvantificiranih analita između skupine ispitanika s dijagnosticiranim OAB-om prije početka terapije i kontrolne skupine, Mann-Whitney U testom analizirala se razlika u omjerima koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu između tih skupina u svrhu utvrđivanja neurotrofina i citokina kao dijagnostičkih biljega.

Ukoliko nije bilo statistički značajne razlike u udjelu kvantificiranih analita između ispitanika prije i nakon uspješne terapije antikolinergicima, Wilcoxonov test se upotrijebio u analizi razlika omjera koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu između tih skupina u svrhu utvrđivanja neurotrofina i citokina kao biljega praćenja terapije.

U slučaju da je udio rezultata ispod granice kvantifikacije analita bio veći od 30 % Mann-Whitney U test i Wilcoxonov test nisu se koristili.

Spearmanov korelacijski koeficijent se izračunao u analizi povezanosti omjera koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom. Statistički značajne povezanosti (uz $p < 0,05$) procijenjene su prema Coltonovom kriteriju, te se p od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25 smatrao kao nepostojanje povezanosti, p od 0,26 do 0,50 ili -0,26 do -0,50 kao slaba povezanost, p od 0,51 do 0,75 ili -0,51 do -0,75 kao umjerena do dobra povezanost, te p od 0,76 do 1 ili -0,76 do -1 kao vrlo dobra do izvrsna povezanost.

ROC (engl. *receiver operating characteristic*) krivulja se analizirala radi utvrđivanja specifičnosti, osjetljivosti, negativnih i pozitivnih prediktivnih vrijednosti omjera koncentracija neurotrofina i citokina i kreatinina u urinu.

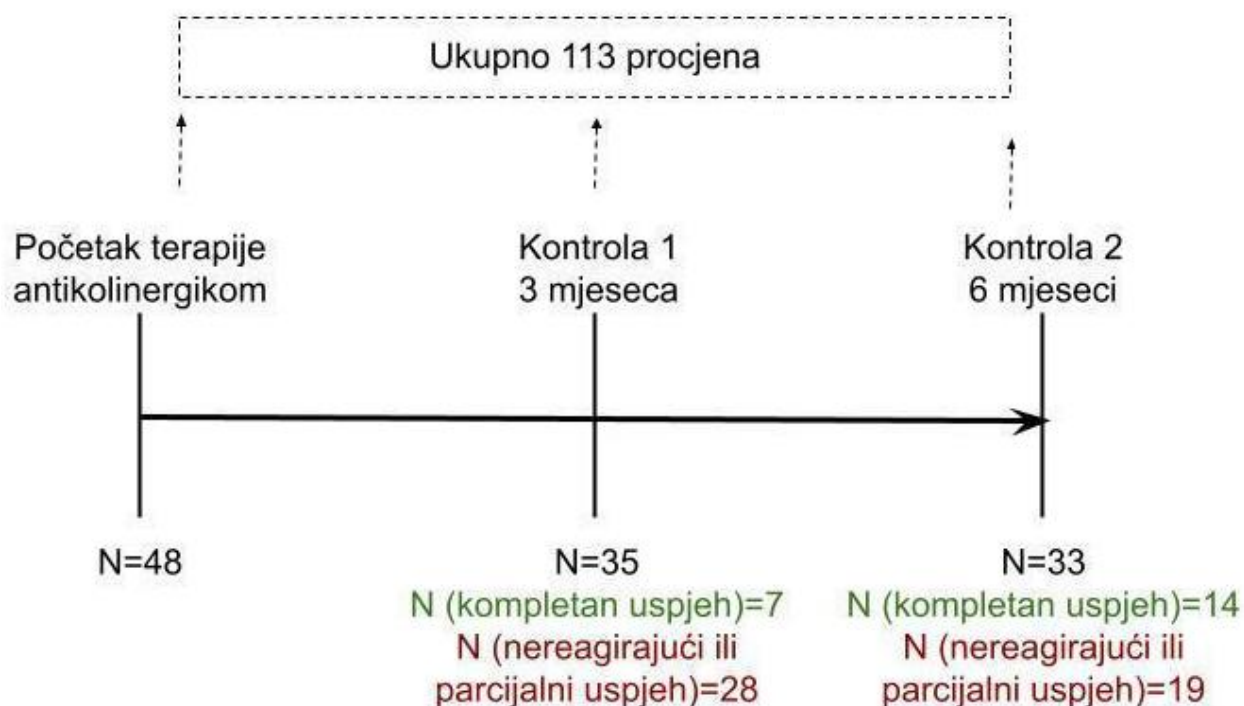
Vrijednost $\alpha < 0,05$ je smatrana statistički značajna za sve postupke. Statistička analiza se provela programom Medcalc (Belgija, verzija 18.9).

3.7 Etička načela

Prilikom uključivanja ispitanika i kontrolnih ispitanika u istraživanje, roditelji ili skrbnici djeteta dali su privolu za uključivanje potpisivanjem informiranog pristanka. Ukoliko je dijete bilo starije od 12 godina i ono je potpisalo pristanak. Identitet ispitanika i kontrolnih ispitanika bio je zaštićen jedinstvenim identifikacijskim brojem u svim obrascima koji su se koristili tijekom istraživanja. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije (80). Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb dalo je pozitivno mišljenje za provedbu istraživanja na sjednici održanoj 13. svibnja 2015. godine (Ur. broj: 02-26/10-8-15). Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta je na 3. redovitoj sjednici održanoj online, 7. prosinca 2021. godine donijelo odluku o odobrenju provođenja istraživanja (Klasa: 643-02/21-03/01, Ur. broj: 251-62-03-21-52).

4. Rezultati

Dijagram toka pristupanja ispitanika pregledima po započinjanju terapije antikolinergikom prikazan je na slici 2.



Slika 2. Dijagram toka pristupanja ispitanika kontrolnim pregledima.

N, broj

U tablici 2 prikazani su demografski podatci ispitanika, te podatci o pristupanju kontrolnim pregledima i uspjehu terapije. Podatci su prikazani kao medijan (IQR) za kontinuirane podatke te apsolutni broj (udio) za kategorijske varijable. Dob je prikazana kao medijan (raspon).

Tablica 2. Demografski podatci o ispitanicima i kontrolnim ispitanicima, te podatci o kontrolnim pregledima

	Ispitanici (N=48)	Kontrolni ispitanici (N=48)
Dob, godine	7 (3 - 17)	13 (6-17)
Ženski spol	43 (0,90)	19 (0,40)
Trajanje simptoma, godine	1 (0,6 - 3)	NA
Pristup kontrolnom pregledu		
3 mjeseca	35 (0,73)	NA
6 mjeseci	33 (0,69)	
Uspjeh na kontrolnom pregledu		
Nereagirajući ili parcijalni uspjeh	30 (0,62)	NA
Kompletan uspjeh	18 (0,38)	
Provedena urodinamika		
Uključenje	39 (0,81)	NA
Kontrolni pregled 3 mjeseca	5 (0,14)	
Kontrolni pregled 6 mjeseci	6 (0,18)	
Liječenje konstipacije	5 (0,10)	0 (0)

N, broj; NA, nije primjenjivo

Udio pacijenata s potpunim uspjehom na kontrolnim procjenama u skladu je s prethodno objavljenim podacima o uspjehu antikolinergičke terapije u liječenju djece s OAB-om (79).

Tablica 3 prikazuje kliničke simptome i druge varijable značajne u dijagnostici i praćenju OAB-a kod djece prije započinjanja terapije, te nakon procjene uspješnosti terapije na kontrolnim pregledima. Podatci su prikazani kao medijan (IQR) za kontinuirane podatke te apsolutni broj (udio) za kategorijske varijable.

Tablica 3. Klinički simptomi i varijable ispitanika s OAB-om

Varijable	Uključenje (N=48)	Kontrolna procjena - potpuni uspjeh (N=21)	Kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh (N=47)
Dnevnik kontinencije			
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	3 (3 - 3)	3 (3 - 4)	3 (3 - 4)
Hitnost, N u 2 tjedna	36 (18 - 49)	0 (0 - 0)	12 (4 - 33)
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	6 (1 - 22)	0 (0 - 0)	3 (0 - 9)
Nokturija, N u 2 tjedna	0 (0 - 4)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
Enureza, N u 2 tjedna	0 (0 - 6)	0 (0 - 0)	0 (0 - 2)
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja			
Prosječni broj mokrenja u danu	10 (7 - 11)	6 (5 - 8)	8 (7 - 10)
Maksimalni volumen mokrenja, mL	200 (134 - 243)	210 (190 - 300)	210 (180 - 270)
Prosječni volumen mokrenja, mL	94 (65 - 124)	152 (142 - 182)	113 (92 - 135)
Noćna diureza, mL	200 (126 - 253)	195 (153 - 233)	230 (150 - 317)
Dnevni unos tekućine, mL	1125 (800 - 1500)	1150 (1000 - 1400)	1300 (800 - 1500)
Dnevni unos tekućine po kg, mL	37 (31 - 59)	52 (38 - 61)	29 (18 - 57)
Indeks hiperaktivnosti	40 (19 - 61)	8 (-10 - 19)	49 (29 - 66)
OABSS	7 (5 - 8)	0 (0 - 1)	5 (3 - 6)
Mikciometrija			
Maksimalna brzina protoka, mL/s	17 (13 - 20)	19 (14 - 23)	18 (11 - 22)
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	5 (4 - 9)	5 (3 - 11)	5 (4 - 8)
Ispražnjeni volumen, mL	149 (114 - 217)	200 (115 - 248)	185

			(109 - 258)
Vrijeme protoka, s	17 (12 - 23)	16 (13 - 23)	13 (11 - 19)
Vrijeme pražnjenja, s	18 (12 - 31)	20 (13 - 23)	14 (11 - 19)
Prosječna brzina protoka, mL/s	9 (6 - 12)	11 (8 - 12)	12 (7 - 16)
Rezidualni volumen, mL	0 (0 - 5)	0 (0 - 1)	0 (0 - 7)
Indeks protoka	0,75 (0,63 - 1)	0,75 (0,67 - 1)	0,79 (0,62 - 1)
Ultrazvuk mokraćnog mjehura			
Debljina stijenke mjehura, mm	2,7 (2 - 3)	2,5 (2,1 - 3)	2,4 (2 - 3)
Promjer transverzalnog rektuma, cm	2,2 (2 - 3)	2 (1,8 - 2,9)	2 (1,9 - 3)
Urodinamsko ispitivanje			
Broj neinhibiranih kontrakcija	2 (0 - 5)	3 (0 - 8)	4 (0 - 13)
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	80 (48 - 105)	96 (66 - 127)	73 (54 - 92)
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	13 (10 - 20)	21 (13 - 27)	25 (9 - 28)
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	24 (14 - 47)	28 (23 - 51)	35 (17 - 58)
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	10 (4 - 16)	6 (4 - 7)	6 (4 - 11)
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	149 (108 - 194)	201 (170 - 219)	164 (143 - 203)
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	60(39 - 72)	109 (99 - 1169)	86 (74 - 105)

4.1 BDNF

Koncentracija BDNF u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila $< 0,07$ ng/mL u 150 (91 %) uzoraka analiziranih ELISA metodom, a $< 1,33$ pg/mL u 121 (74 %) uzorku analizom Luminex metodom.

Tablica 4 predstavlja pregled omjera kvantificiranih koncentracija BDNF-a i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 4. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija BDNF-a i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
BDNF/kreatinin, ng/mL/mmol/L ELISA metoda (0,07 - 16 ng/mL*)	Ispitanici prije terapije	1 (0,02)	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	4/21	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	8 (0,17)	D=0,2589 (p> 0,10)	0,09 (0,05 - 0,14)
	Kontrolni ispitanici	1 (0,02)	NA	NA
BDNF/kreatinin, pg/mL/mmol/L Luminex metoda (1,33 - 5450 pg/mL*)	Ispitanici prije terapije	5 (0,10)	D=0,4311 (p=0,003)	0,27 (0,22 - 1,87)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	6/21	D=0,2994 (p=0,100)	0,44 (0,20 - 1,51)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	21 (0,45)	D=0,2766 (p<0,001)	0,32 (0,14 - 0,99)
	Kontrolni ispitanici	11 (0,23)	D=0,4112 (p<0,001)	0,16 (0,08 - 0,23)

*detekcijski raspon

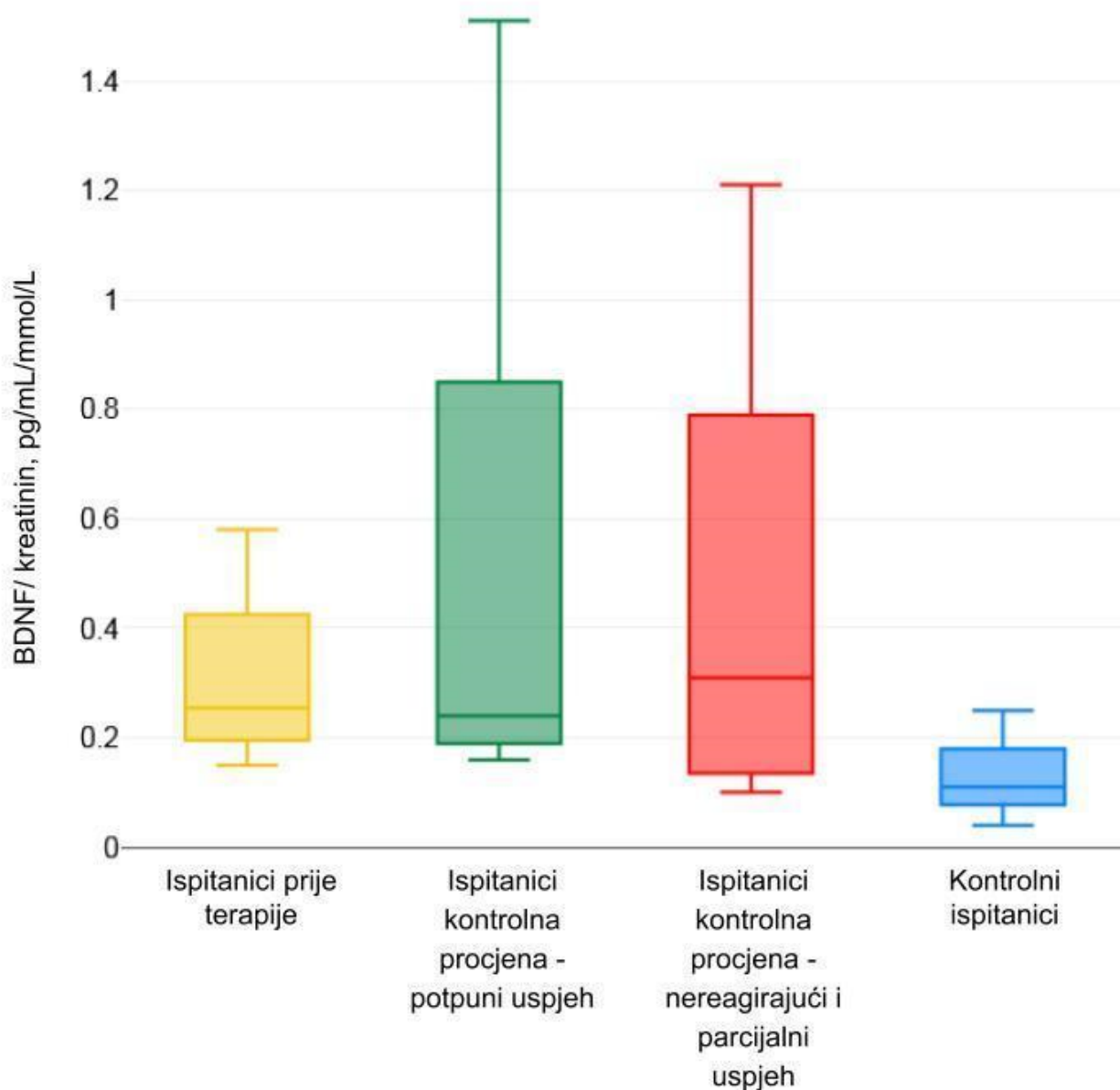
NA,

nije

primjenjivo

Statistički iznačajne p vrijednosti (p< 0,05) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon s omjerima koncentracija BDNF-a dobivenih Luminex metodom i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 3.



Slika 3. Omjeri koncentracija BDNF-a dobivenih Luminex metodom i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije BDNF-a i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika dobivenih ELISA metodom ($p=1,000$), kao niti onih dobivenih Luminex metodom ($p=0,111$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između udjela omjera kvantificiranih rezultata BDNF-a i kreatinina između ispitanika prije

započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije antikolinergicima ELISA metodom ($p=0,063$), kao niti Luminex metodom ($p=0,125$).

S obzirom na visoki udio rezultata ispod granice kvantifikacije (granica kvantifikacije ELISA metodom 0,07 ng/mL; granica kvantifikacije Luminex metodom 1,33 pg/mL) nije provedena analiza kvantitativnim statističkim testovima, uključujući ROC analizu.

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija BDNF-a i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija BDNF-a i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Varijable	BDNF/kreatinin ng/mL/mmol/L (ELISA metoda)	BDNF/kreatinin pg/mL/mmol/L (Luminex metoda)
Dnevnik kontinencije		
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=5 $p=0,00$ $p=NA$	N=22 $p=0,40$ $p=0,067$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=12 $p=0,17$ $p=0,589$	N=31 $p=-0,16$ $p=0,388$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=12 $p=-0,10$ $p=0,754$	N=31 $p=0,00$ $p=0,999$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=12 $p=0,22$ $p=0,491$	N=29 $p=0,17$ $p=0,383$
Enureza, N u 2 tjedna	N=12 $p=-0,13$ $p=0,685$	N=29 $p=-0,16$ $p=0,414$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja		
Prosječni broj mokrenja u danu	N=11	N=27

	$\rho=0,12$ $p=0,733$	$\rho=0,07$ $p=0,741$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=10 $\rho=0,45$ $p=0,197$	N=27 $\rho=0,20$ $p=0,323$
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=8 $\rho=0,67$ $p=0,071$	N=20 $\rho=0,08$ $p=0,736$
Noćna diureza, mL	N=10 $\rho=0,47$ $p=0,173$	N=27 $\rho=0,31$ $p=0,122$
Dnevni unos tekućine, mL	N=11 $\rho=0,49$ $p=0,123$	N=27 $\rho=0,21$ $p=0,285$
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=11 $\rho=-0,23$ $p=0,500$	N=25 $\rho=0,40$ $p=0,050$
Indeks hiperaktivnosti	N=8 $\rho=0,19$ $p=0,651$	N=23 $\rho=-0,23$ $p=0,297$
OABSS	N=11 $\rho=0,29$ $p=0,394$	N=25 $\rho=-0,07$ $p=0,742$
Mikciometrija		
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=6 $\rho=0,41$ $p=0,425$	N=24 $\rho=-0,25$ $p=0,244$
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=4 $\rho=0,40$ $p=0,600$	N=19 $\rho=0,08$ $p=0,756$
Ispražnjeni volumen, mL	N=6 $\rho=0,54$ $p=0,266$	N=24 $\rho=-0,14$ $p=0,511$
Vrijeme protoka, s	N=4 $\rho=-0,21$ $p=0,789$	N=19 $\rho=0,15$ $p=0,554$
Vrijeme pražnjenja, s	N=4 $\rho=-0,20$ $p=0,800$	N=19 $\rho=0,16$ $p=0,508$

Prosječna brzina protoka, mL/s	N=4 $\rho=0,74$ $p=0,262$	N=19 $\rho=-0,38$ $p=0,107$
Rezidualni volumen, mL	N=7 $\rho=0,20$ $p=0,661$	N=25 $\rho=-0,22$ $p=0,301$
Indeks protoka	N=6 $\rho=-0,26$ $p=0,623$	N=24 $\rho=-0,25$ $p=0,240$
Ultrazvuk mokraćnog mjehura		
Debljina stijenke mjehura, mm	N=8 $\rho=0,06$ $p=0,888$	N=23 $\rho=-0,05$ $p=0,825$
Promjer transverzalnog rektuma, cm	N=7 $\rho=0,11$ $p=0,818$	N=18 $\rho=-0,22$ $p=0,384$
Urodinamsko ispitivanje		
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=4 $\rho=-0,74$ $p=0,262$	N=7 $\rho=-0,15$ $p=0,747$
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=2 $\rho=NA$ $p=NA$	N=4 $\rho=0,40$ $p=0,600$
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=4 $\rho=-1,00$ $p< 0,001$	N=7 $\rho=-0,69$ $p=0,086$
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=4 $\rho=-1,00$ $p< 0,001$	N=7 $\rho=-0,43$ $p=0,333$
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	N=3 $\rho=1,00$ $p=NA$	N=6 $\rho=0,49$ $p=0,321$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=3 $\rho=1,00$ $p=NA$	N=6 $\rho=0,03$ $p=0,957$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=3 $\rho=0,50$ $p=0,667$	N=6 $\rho=0,41$ $p=0,425$

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; NA, nije primjenjivo; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.2 NGF

Koncentracija NGF u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila < 6,86 pg/mL u 158 (96 %) uzoraka analiziranih ELISA metodom, a < 7,35 pg/mL u svih 164 (100 %) uzoraka analizom Luminex metodom.

Zbog niskog udjela kvantificiranih koncentracija NGF-a, nije bilo moguće provesti Kolmogorov-Smirnov test.

Tablica 6. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija NGF-a i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
NGF/kreatinin, pg/mL/mmol/L ELISA metoda	Ispitanici prije terapije	1 (0,02)	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	1/21	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	4 (0,09)	NA	NA
	Kontrolni ispitanici	0 (0,00)	NA	NA
NGF/kreatinin, pg/mL/mmol/L Luminex metoda	Ispitanici prije terapije	0 (0,00)	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	0/21	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	0 (0,00)	NA	NA
	Kontrolni ispitanici	0 (0,00)	NA	NA

NA, nije primjenjivo.

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije NGF-a i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika dobivenih ELISA metodom ($p=1,000$), kao niti onih dobivenih Luminex metodom ($p=1,000$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između udjela omjera kvantificiranih rezultata BDNF-a i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije antikolinergicima ELISA metodom ($p=1,000$), a za rezultate dobivene Luminex metodom bilo je nemoguće odrediti razliku ($p=NA$).

S obzirom na visoki udio rezultata ispod granice kvantifikacije (granica kvantifikacije ELISA metodom 6,86 pg/mL ng/mL; granica kvantifikacije Luminex metodom 7,35 pg/mL) nije provedena analiza kvantitativnim statističkim testovima, uključujući ROC analizu.

Određivanje Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija NGF-a određenih Luminex metodom i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom nije provedeno.

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija NGF-a određenih ELISA metodom i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 7. Prikazani su podatci samo za parove rezultata gdje je bilo moguće odrediti Spearmanov korelacijski koeficijent.

Tablica 7. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija NGF-a i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	NGF/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=3 $p=0,00$ $p=1,000$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=6 $p=-0,24$ $p=0,648$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=6 $p=0,49$

	p=0,321
Nokturija, N u 2 tjedna	N=5 ρ =-0,16 p=0,792
Enureza, N u 2 tjedna	N=6 ρ =-0,14 p=0,798
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=4 ρ =0,20 p=0,800
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=3 ρ =-0,50 p=0,667
Dnevni unos tekućine, mL	N=5 ρ =-0,30 p=0,624
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=3 ρ =-1,00 p=NA
OABSS	N=4 ρ =0,80 p=0,200
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=5 ρ =0,67 p=0,219
Promjer transverzalnog rektuma, cm	N=4 ρ=1,00 p< 0,001

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; NA, nije primjenjivo; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*). Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.3 IL-1 α

Koncentracija IL-1 α u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila < 0,79 pg/mL u 59 (53 %) uzoraka analiziranih Luminex metodom.

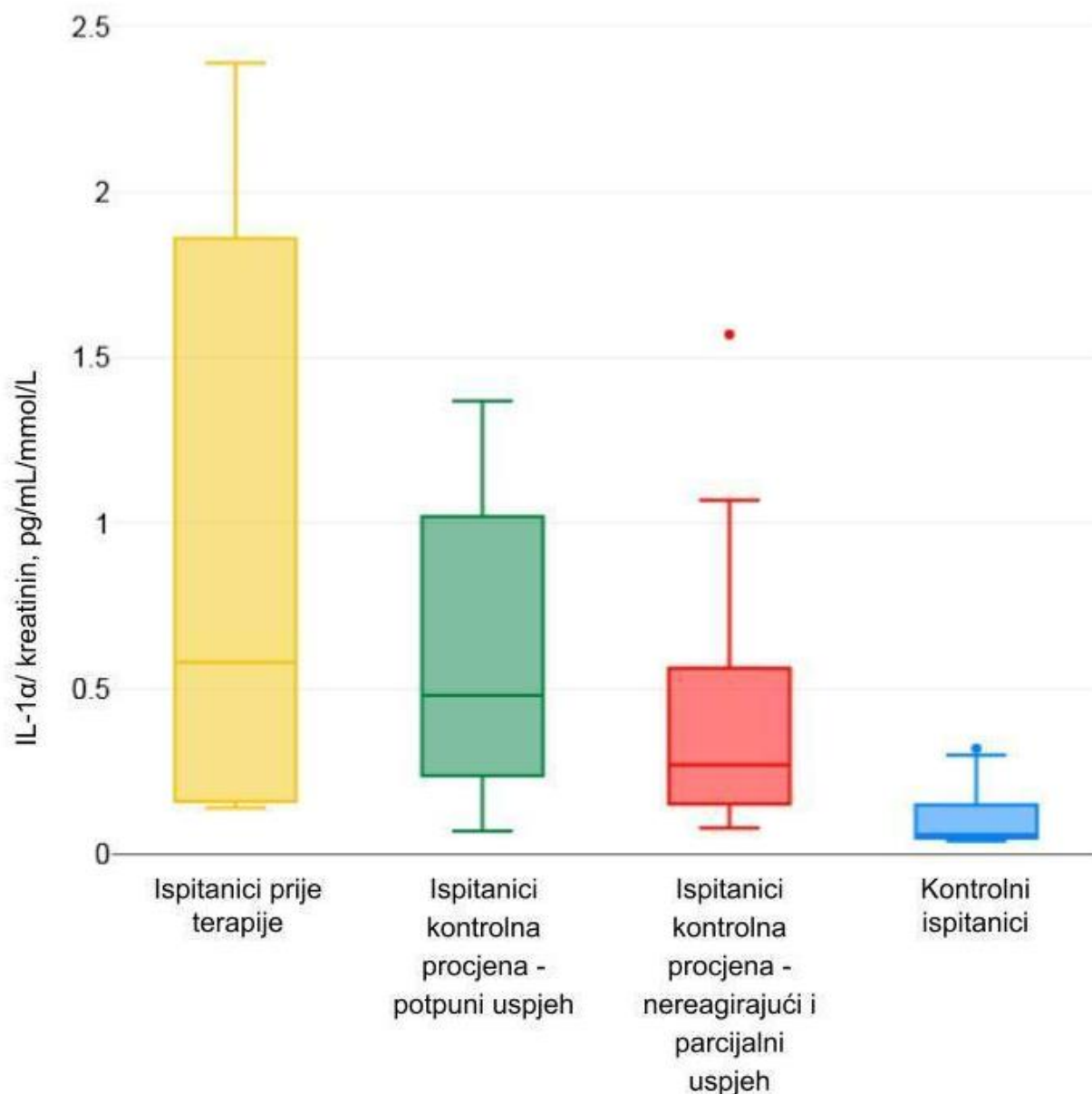
Tablica 8 predstavlja pregled omjera kvantificiranih koncentracija IL-1 α i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 8. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija IL-1 α i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
IL-1 α / kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	7/21	D=0,2859 (p=0,087)	0,94 (0,18 - 2,26)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	10/18	D=0,2340 (p> 0,10)	0,63 (0,24 - 1,02)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	23 (0,50)	D=0,301 (p< 0,001)	0,28 (0,17 - 0,74)
	Kontrolni ispitanici	13/27	D=0,4227 (p< 0,001)	0,06 (0,05 - 0,22)

Statistički iznačajne p vrijednosti (p< 0,05) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s omjerima koncentracija IL-1 α i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 4.



Slika 4. Omjeri koncentracija IL-1 α i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno kako nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije IL-1 α i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=0,382$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između udjelu omjera kvantificiranih rezultata IL-1 α i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=1,000$).

Budući da je udio mjerljivih rezultata IL-1 α iznosio 47 %, nije provedena analiza kvantitativnim statističkim testovima, uključujući ROC analizu.

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija IL-1 α i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija IL-1 α i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	IL-1 α /kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=28 $\rho=-0,08$ $p=0,671$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=38 $\rho=-0,25$ $p=0,124$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=38 $\rho=-0,22$ $p=0,180$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=35 $\rho=-0,21$ $p=0,238$
Enureza, N u 2 tjedna	N=35 $\rho=-0,03$ $p=0,881$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=33 $\rho=0,21$ $p=0,245$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=31 $\rho=0,11$ $p=0,556$
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=23 $\rho=-0,32$ $p=0,143$

Noćna diureza, mL	N=31 $\rho=-0,13$ $p=0,474$
Dnevni unos tekućine, mL	N=34 $\rho=-0,14$ $p=0,416$
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=34 $\rho=-0,06$ $p=0,752$
Indeks hiperaktivnosti	N=40 $\rho=0,01$ $p=0,978$
OABSS	N=29 $\rho=-0,12$ $p=0,542$
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=26 $\rho=-0,02$ $p=0,925$
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=23 $\rho=0,02$ $p=0,927$
Ispražnjeni volumen, mL	N=27 $\rho=-0,06$ $p=0,781$
Vrijeme protoka, s	N=23 $\rho=0,20$ $p=0,353$
Vrijeme pražnjenja, s	N=23 $\rho=0,12$ $p=0,603$
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=23 $\rho=-0,15$ $p=0,492$
Rezidualni volumen, mL	N=28 $\rho=0,31$ $p=0,113$
Indeks protoka	N=25 $\rho=0,01$

	p=0,961
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=30 $\rho=0,05$ p=0,813
Promjer transverzalnog rektuma, cm	N=26 $\rho=0,12$ p=0,557
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=6 $\rho=-0,03$ p=0,957
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=4 $\rho=-0,40$ p=0,600
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=6 $\rho=-0,35$ p=0,499
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=6 $\rho=-0,29$ p=0,957
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	N=5 $\rho=0,60$ p=0,285
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=5 $\rho=-0,60$ p=0,285
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=5 $\rho=-0,10$ p=0,873

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; NA, nije primjenjivo ; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.4 IL-1 RA

Koncentracija IL-1 RA u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila kvantificirana (odnosno u mjernom rasponu 160,25 - 164100 pg/mL) u 162 (99 %) uzorka analiziranih Luminex metodom.

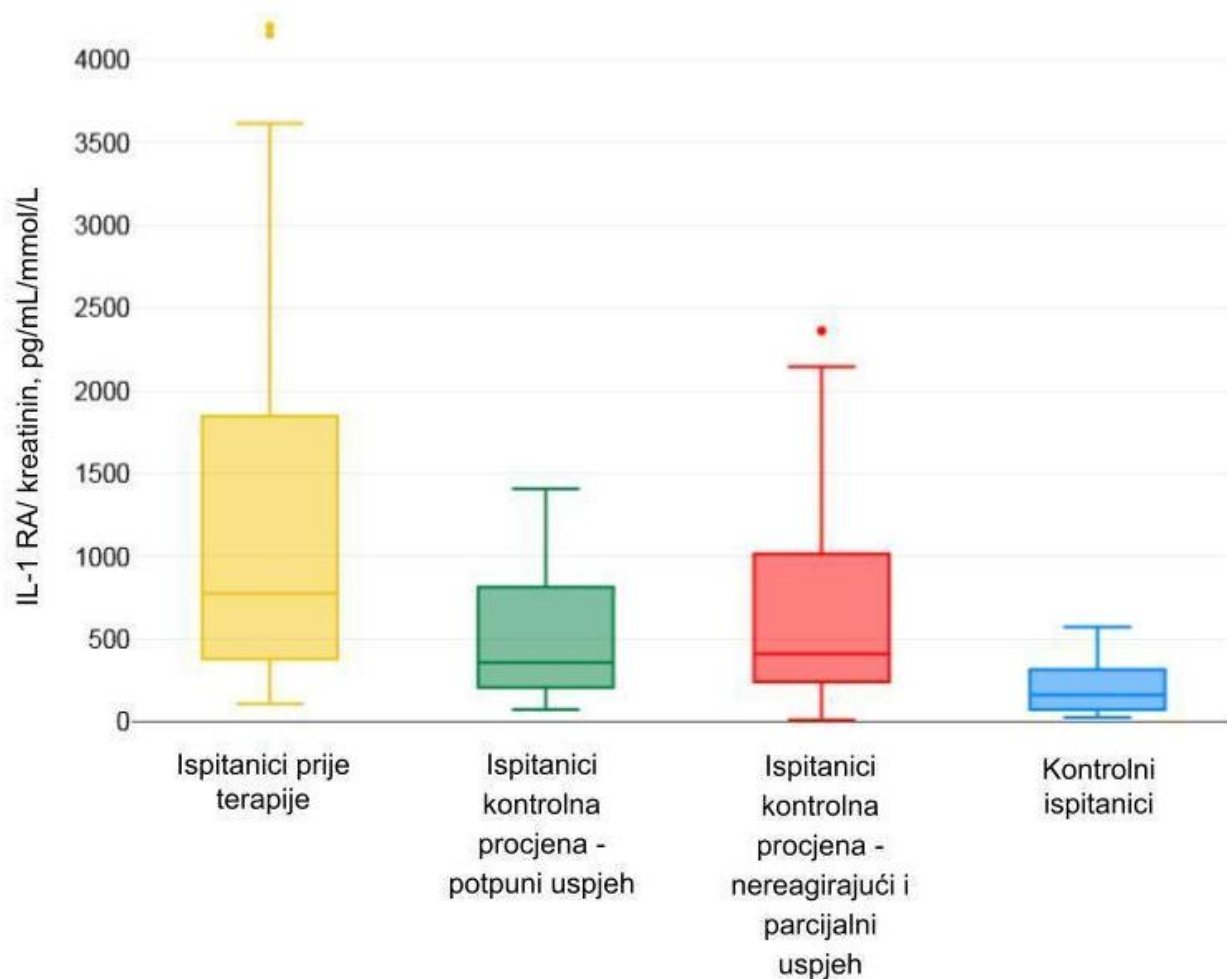
Tablica 10 predstavlja pregled omjera kvantificiranih koncentracija IL-1 RA i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 10. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija IL-1 RA i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
IL-1 RA/ kreatinin, pg/mL/mmol/L Luminex metoda	Ispitanici prije terapije	47 (0,98)	D=0,1966 (p=0,001)	803 (382,77 - 1983,68)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	21/21	D=0,4034 (p< 0,001)	394,83 (228,28 - 1177,92)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	47 (1,00)	D=0,3842 (p< 0,001)	464,83 (247,10 - 1099,58)
	Kontrolni ispitanici	47 (0,98)	D=0,349 (p< 0,001)	193 (101,43 - 399,56)

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s mjerima koncentracija IL-1 RA i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 5.



Slika 5. Omjeri koncentracija IL-1 RA i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije IL-1 RA i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=1,000$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između udjela omjera kvantificiranih rezultata IL-1 RA i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=1,000$).

Mann-Whitney U testom analizirala se razlika u omjerina koncentracija IL-1 RA i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika. Testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između tih dviju skupina ($p<0,001$).

Wilcoxonov test se upotrijebio u analizi razlika omjera koncentracija IL-1 RA i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješne terapije

antikolinergicima. Testom je utvrđeno kako nije bilo razlike između testiranih skupina ($p=0,765$).

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija IL-1 RA i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija IL-1 RA i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	IL-1 RA/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=78 $\rho=-0,02$ $p=0,872$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=111 $\rho=0,12$ $p=0,210$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=111 $\rho=0,10$ $p=0,293$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=108 $\rho=0,04$ $p=0,651$
Enureza, N u 2 tjedna	N=109 $\rho=0,13$ $p=0,164$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=100 $\rho=0,09$ $p=0,370$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=49 $\rho=0,07$ $p=0,624$
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=100

	$\rho=0,09$ $p=0,370$
Noćna diureza, mL	N=95 $\rho=0,24$ $p=0,018$
Dnevni unos tekućine, mL	N=98 $\rho=0,07$ $p=0,500$
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=91 $\rho=-0,20$ $p=0,055$
Indeks hiperaktivnosti	N=67 $\rho=0,05$ $p=0,703$
OABSS	N=96 $\rho=0,18$ $p=0,076$
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=89 $\rho=-0,03$ $p=0,795$
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=70 $\rho=0,27$ $p=0,025$
Ispražnjeni volumen, mL	N=86 $\rho=0,21$ $p=0,048$
Vrijeme protoka, s	N=70 $\rho=0,33$ $p=0,006$
Vrijeme pražnjenja, s	N=70 $\rho=0,27$ $p=0,026$
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=70 $\rho=-0,02$ $p=0,864$
Rezidualni volumen, mL	N=83 $\rho=-0,08$ $p=0,490$

Indeks protoka	N=88 $\rho=-0,13$ $p=0,232$
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=81 $\rho=0,11$ $p=0,326$
Promjer transverzalnog rektuma, cm	N=68 $\rho=0,11$ $p=0,391$
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=49 $\rho=-0,06$ $p=0,682$
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=30 $\rho=0,17$ $p=0,374$
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=48 $\rho=0,02$ $p=0,872$
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=49 $\rho=0,07$ $p=0,624$
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	N=48 $\rho=0,23$ $p=0,110$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=48 $\rho=0,12$ $p=0,436$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=48 $\rho=0,06$ $p=0,667$

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Tablica 12 prikazuje rezultate analize ROC krivulje radi utvrđivanja specifičnosti, osjetljivosti, negativnih i pozitivnih prediktivnih vrijednosti omjera koncentracije IL-1 RA i kreatinina u urinu.

Tablica 12. Analiza ROC krivulje (ispitanici prije terapije vs. kontrolni ispitanici)

	IL-1 RA/kreatinin pg/mL/mmol/L
Ispitanici	N=47
Kontrolni ispitanici	N=47
Granica	> 367,11
Osjetljivost (%)	78,72 %
Specifičnost (%)	74,47 %
Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	25,50 %
Negativna prediktivna vrijednost (%)	96,90 %
Youdenov indeks	0,5319
Površina ispod krivulje	0,819
p vrijednost	p< 0,001

N, broj

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.5 IL-6

Koncentracija IL-6 u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila $< 12,89$ pg/mL u 107 (96 %) uzoraka analiziranih Luminex metodom.

Tablica 13 predstavlja pregled omjera kvantificiranih koncentracija IL-6 i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 13. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija IL-6 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
IL-6/ kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	0/21	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	2/18	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	1 (0,02)	NA	NA
	Kontrolni ispitanici	2/27	NA	NA

NA, nije primjenjivo

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije IL-6 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=0,497$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između omjera udjela kvantificiranih rezultata IL-6 i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=0,500$).

S obzirom na visoki udio rezultata ispod granice kvantifikacije (granica kvantifikacije Luminex metodom $12,89$ pg/mL), nije provedena analiza kvantitativnim statističkim testovima, uključujući ROC analizu.

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija IL-6 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 14. Prikazani su podatci samo za parove rezultata gdje je bilo moguće odrediti Spearmanov korelacijski koeficijent.

Tablica 14. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija IL-6 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	IL-6/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Hitnost, N u 2 tjedna	N=3 $\rho=0,00$ p=NA
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=3 $\rho=0,00$ p=NA
Nokturija, N u 2 tjedna	N=3 $\rho=0,00$ p=NA
Enureza, N u 2 tjedna	N=3 $\rho=0,87$ p=0,333
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=3 $\rho=0,50$ p=0,667

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; NA, nije primjenjivo.

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.6 CCL2

Koncentracija CCL2 u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila kvantificirana (odnosno u mjernom rasponu 4,22 - 17300 pg/mL) u 164 (100 %) uzorka analiziranih Luminex metodom.

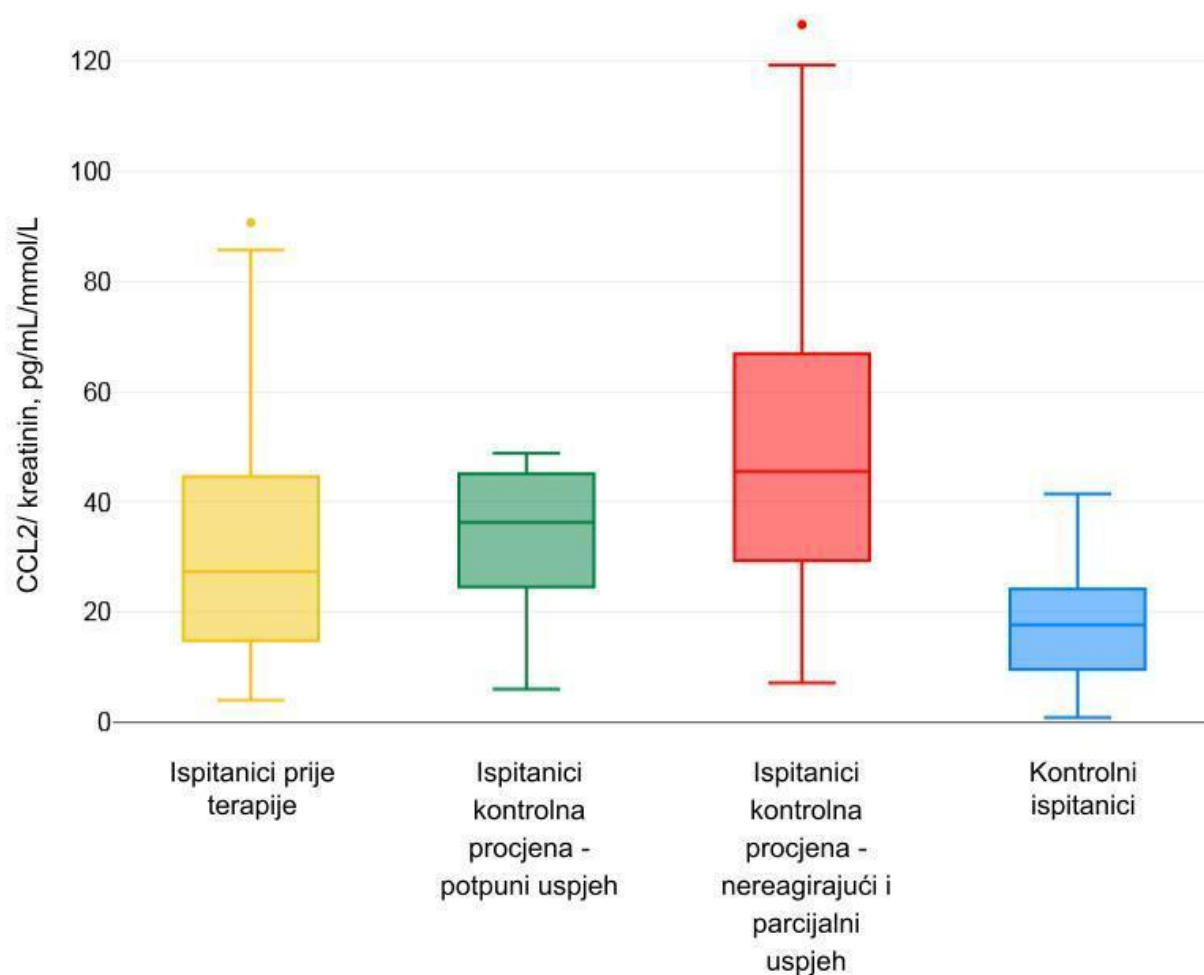
Tablica 15 predstavlja pregled omjera koncentracija CCL2 i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 15. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija CCL2 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
CCL2/ kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	48 (1,00)	D=0,2714 (p< 0,001)	28,49 (15,50 - 47,95)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	21/21	D=0,4176 (p< 0,001)	42,71 (29,82 - 47,06)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	47 (1,00)	D=0,1156 (p> 0,10)	46,39 (29,36 - 70,37)
	Kontrolni ispitanici	48 (1,00)	D=0,3712 (p< 0,001)	19,08 (10,77 - 25,70)

Statistički iznačajne p vrijednosti (p< 0,05) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s omjerima koncentracija CCL2 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 6.



Slika 6. Omjeri koncentracija CCL2 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Mann-Whitney U testom analizirala se razlika u omjerima koncentracija CCL2 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika. Testom je potvrđeno postojanje statistički značajne razlike između tih dviju skupina ($p=0,011$).

Wilcoxonov test se upotrijebio u analizi razlika omjera koncentracija CCL2 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješne terapije antikolinergicima. Testom je utvrđeno da nije bilo statistički značajne razlike između skupina ($p=0,079$).

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija CCL2 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija CCL i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	CCL2/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=79 $\rho=-0,09$ $p=0,420$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=112 $\rho=-0,22$ $p=0,022$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=113 $\rho=-0,07$ $p=0,453$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=109 $\rho=-0,13$ $p=0,192$
Enureza, N u 2 tjedna	N=110 $\rho=0,00$ $p=0,976$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=101 $\rho=0,09$ $p=0,392$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=99 $\rho=0,01$ $p=0,943$
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=71 $\rho=-0,10$ $p=0,432$
Noćna diureza, mL	N=96 $\rho=0,05$ $p=0,606$
Dnevni unos tekućine, mL	N=99 $\rho=-0,04$

	p=0,668
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=92 $\rho=0,14$ p=0,190
Indeks hiperaktivnosti	N=68 $\rho=-0,07$ p=0,593
OABSS	N=97 $\rho=-0,09$ p=0,364
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=90 $\rho=0,14$ p=0,204
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=70 $\rho=-0,18$ p=0,144
Ispražnjeni volumen, mL	N=87 $\rho=-0,10$ p=0,371
vrijeme protoka, s	N=70 $\rho=-0,20$ p=0,106
Vrijeme pražnjenja, s	N=70 $\rho=-0,20$ p=0,095
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=70 $\rho=0,18$ p=0,140
Rezidualni volumen, mL	N=84 $\rho=0,07$ p=0,541
Indeks protoka	N=89 $\rho=0,17$ p=0,121
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=81 $\rho=-0,05$ p=0,645

Promjer transverzalnog rektuma, cm	N=68 $\rho=-0,25$ $p=0,041$
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=50 $\rho=0,25$ $p=0,077$
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=30 $\rho=0,09$ $p=0,656$
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=49 $\rho=0,10$ $p=0,503$
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=50 $\rho=0,25$ $p=0,084$
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	N=49 $\rho=-0,15$ $p=0,298$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=49 $\rho=-0,04$ $p=0,808$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=49 $\rho=0,34$ $p=0,017$

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Tablica 17 prikazuje rezultate analize ROC krivulje radi utvrđivanja specifičnosti, osjetljivosti, negativnih i pozitivnih prediktivnih vrijednosti omjera koncentracije CCL2 i kreatinina u urinu.

Tablica 17. Analiza ROC krivulje (ispitanici prije terapije vs. kontrolni ispitanici)

CCL2/kreatinin pg/mL/mmol/L	
Ispitanici	N=48
Kontrolni ispitanici	N=48
Granica	> 26,15
Osjetljivost (%)	54,17 %
Specifičnost (%)	77,08 %
Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	20,80 %
Negativna prediktivna vrijednost (%)	93,80 %
Youdenov indeks	0,3125
Površina ispod krivulje	0,651
p vrijednost	0,0074

N, broj

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.7 CCL7

Koncentracija CCL7 u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila < 3.39 pg/ml u 81 (49 %) uzorku analiziranom Luminex metodom.

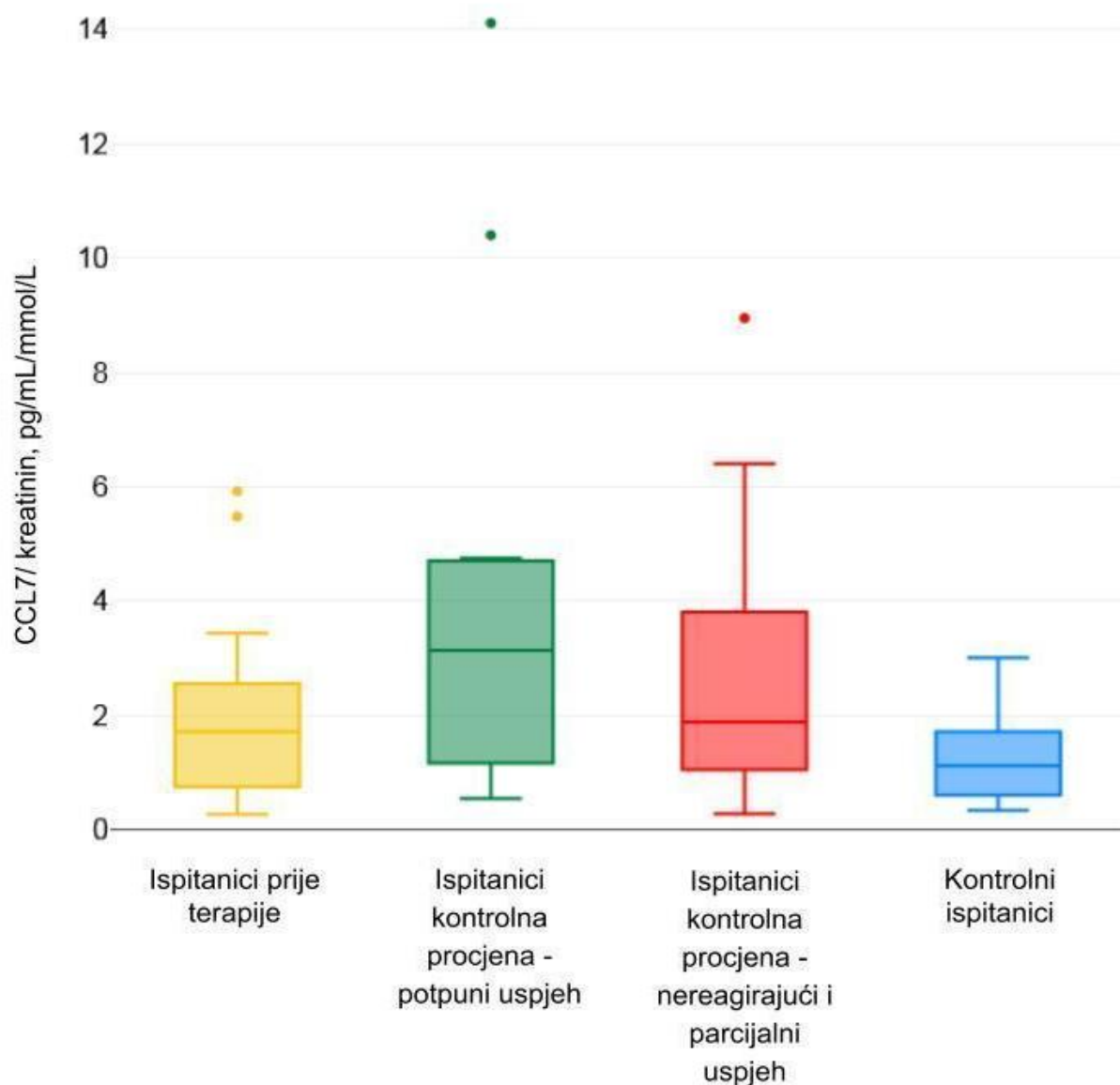
Tablica 18 predstavlja pregled omjera koncentracija CCL7 i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 18. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija CCL7 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
CCL7/ kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	18 (0,38)	D=0,3353 (p< 0,001)	1,76 (0,98 - 3,44)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	12/21	D=0,3537 (p< 0,001)	3,79 (1,18 - 7,58)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	34 (0,72)	D=0,2813 (p< 0,001)	1,89 (1,06 - 4,69)
	Kontrolni ispitanici	19 (0,40)	D=0,4129 (p< 0,001)	1,16 (0,66 - 1,87)

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s omjerima koncentracija CCL7 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 7.



Slika 7. Omjeri koncentracija CCL7 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije CCL7 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=1,000$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između omjera udjela kvantificiranih rezultata CCL7 i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=1,000$).

Budući da je udio mjerljivih rezultata IL-1 α iznosio 51 %, nije provedena analiza kvantitativnim statističkim testovima, uključujući ROC analizu.

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija CCL7 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 19.

Tablica 19. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija CCL7 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	CCL7/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=44 $\rho=-0,09$ $p=0,581$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=61 $\rho=-0,21$ $p=0,108$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=61 $\rho=-0,01$ $p=0,919$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=58 $\rho=-0,11$ $p=0,397$
Enureza, N u 2 tjedna	N=59 $\rho=0,17$ $p=0,212$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=54 $\rho=0,07$ $p=0,657$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=53 $\rho=0,30$ $p=0,030$
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=33 $\rho=0,00$ $p=0,998$

Noćna diureza, mL	N=51 $\rho=0,31$ $p=0,025$
Dnevni unos tekućine, mL	N=55 $\rho=0,29$ $p=0,035$
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=52 $\rho=0,25$ $p=0,071$
Indeks hiperaktivnosti	N=33 $\rho=0,04$ $p=0,848$
OABSS	N=51 $\rho=-0,13$ $p=0,357$
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=44 $\rho=0,12$ $p=0,459$
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=37 $\rho=-0,02$ $p=0,919$
Ispražnjeni volumen, mL	N=44 $\rho=0,01$ $p=0,928$
Vrijeme protoka, s	N=37 $\rho=0,04$ $p=0,823$
Vrijeme pražnjenja, s	N=37 $\rho=0,05$ $p=0,760$
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=37 $\rho=-0,09$ $p=0,617$
Rezidualni volumen, mL	N=44 $\rho=-0,21$ $p=0,178$
Indeks protoka	N=44 $\rho=0,15$

	p=0,348
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=47 ρ=0,12 p=0,433
Promjer transversalnog rektuma, cm	N=39 ρ=-0,10 p=0,548
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=16 ρ=0,40 p=0,128
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=11 ρ=0,30 p=0,370
Bazalni tlak na detruzoru, cmH2O	N=16 ρ=-0,13 p=0,623
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH2O	N=16 ρ=0,23 p=0,392
Rastezljivost, mL/cmH2O	N=15 ρ=-0,34 p=0,216
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=15 ρ=0,35 p=0,196
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=15 ρ=0,57 p=0,026

N, broj; ρ, Spearmanov koeficijent korelacije; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.8 CCL8

Koncentracija CCL8 u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila $< 0,43$ pg/mL u 59 (36 %) uzoraka analiziranih Luminex metodom.

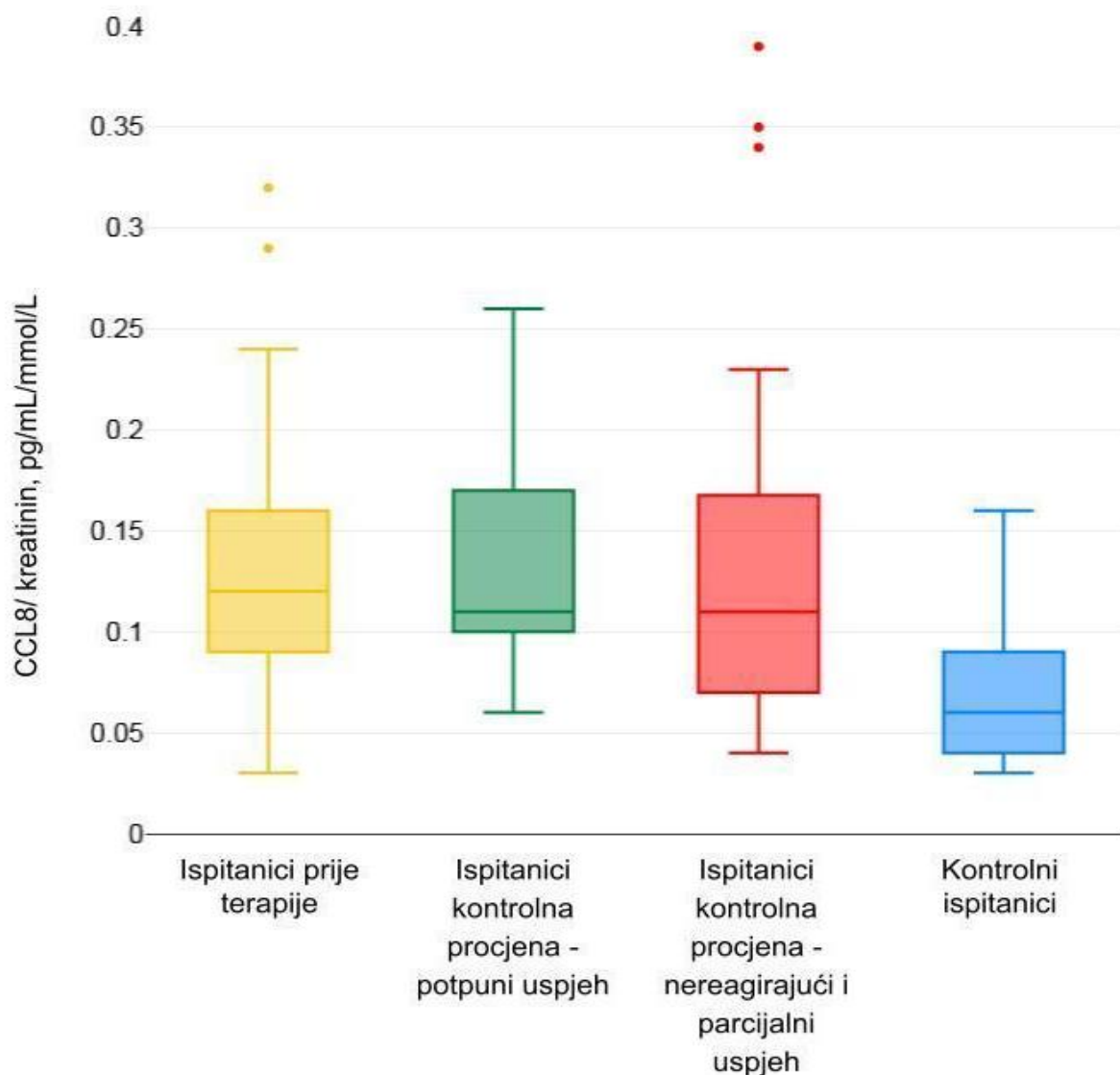
Tablica 20 predstavlja pregled omjera koncentracija CCL8 i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 20. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija CCL8 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
CCL8/ kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	29 (0,60)	D=0,2553 (p< 0,001)	0,13 (0,10 - 0,19)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	12/21	D=0,2473 (p=0,041)	0,12 (0,10 - 0,22)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	26 (0,55)	D=0,2399 (p< 0,001)	0,115 (0,07 - 0,23)
	Kontrolni ispitanici	38 (0,79)	D=0,1886 (p=0,002)	0,08 (0,04 - 0,11)

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s omjerima koncentracija CCL8 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 8.



Slika 8. Omjeri koncentracija CCL8 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije CCL8 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=0,074$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između omjera udjela kvantificiranih rezultata CCL8 i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=0,267$).

S obzirom na visoki udio rezultata ispod granice kvantifikacije (granica detekcije Luminex metodom 0,43 pg/mL) nije provedena analiza kvantitativnim statističkim testovima, uključujući ROC analizu.

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija CCL8 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 21.

Tablica 21. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija CCL8 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	CCL8/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=45 $\rho=0,28$ $p=0,059$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=63 $\rho=-0,01$ $p=0,926$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=64 $\rho=0,17$ $p=0,190$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=62 $\rho=0,05$ $p=0,707$
Enureza, N u 2 tjedna	N=62 $\rho=-0,03$ $p=0,836$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=57 $\rho=0,04$ $p=0,797$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=55 $\rho=-0,06$ $p=0,686$
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=45 $\rho=-0,03$ $p=0,871$

Noćna diureza, mL	N=55 $\rho=0,11$ $p=0,430$
Dnevni unos tekućine, mL	N=57 $\rho=-0,12$ $p=0,374$
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=54 $\rho=0,21$ $p=0,133$
Indeks hiperaktivnosti	N=44 $\rho=-0,19$ $p=0,218$
OABSS	N=54 $\rho=0,24$ $p=0,076$
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=51 $\rho=-0,11$ $p=0,431$
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=41 $\rho=0,13$ $p=0,431$
Ispražnjeni volumen, mL	N=48 $\rho=-0,10$ $p=0,507$
vrijeme protoka, s	N=41 $\rho=0,09$ $p=0,579$
Vrijeme pražnjenja, s	N=41 $\rho=0,07$ $p=0,647$
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=41 $\rho=-0,06$ $p=0,701$
Rezidualni volumen, mL	N=44 $\rho=0,03$ $p=0,826$
Indeks protoka	N=50 $\rho=-0,21$

	p=0,140
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=46 $\rho=-0,24$ p=0,112
Promjer transversalnog rektuma, cm	N=42 $\rho=-0,13$ p=0,406
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=31 $\rho=0,27$ p=0,149
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=19 $\rho=-0,28$ p=0,249
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=30 $\rho=0,04$ p=0,838
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=31 $\rho=0,15$ p=0,432
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	N=31 $\rho=-0,16$ p=0,397
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=31 $\rho=-0,30$ p=0,105
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=31 $\rho=0,10$ p=0,607

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.9 CCL13

Koncentracija CCL13 u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila kvantificirana (odnosno u mjernom rasponu 0,85 - 3500 pg/mL) u 141 (86 %) uzorku analiziranih Luminex metodom.

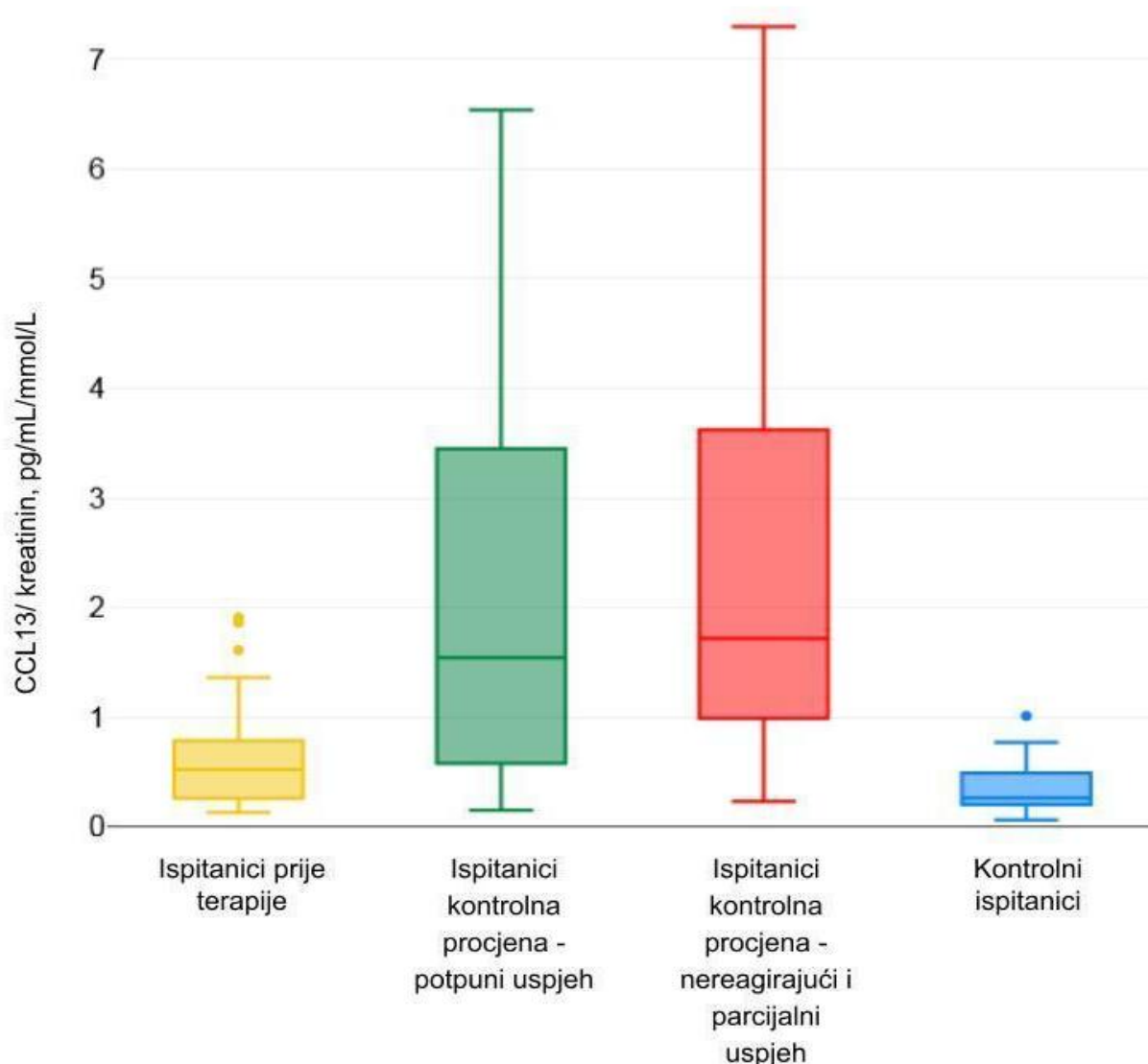
Tablica 22 predstavlja pregled omjera koncentracija CCL13 i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 22. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija CCL13 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
CCL13/ kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	37 (0,77)	D=0,2829 (p< 0,001)	0,61 (0,29 - 1,03)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	18/21	D=0,2483 (p=0,005)	1,79 (0,63 - 4,10)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	43 (0,91)	D=0,1491 (p=0,017)	1,80 (0,99 - 3,76)
	Kontrolni ispitanici	43 (0,90)	D=0,3356 (p< 0,001)	0,32 (0,21 - 0,59)

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s omjerima koncentracija CCL13 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 9.



Slika 9. Omjeri koncentracija CCL13 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije CCL13 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=0,170$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između omjera udjela kvantificiranih rezultata CCL13 i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=0,508$).

Mann-Whitney U testom analizirala se razlika u omjerima koncentracija CCL13 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika.

Testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između tih dviju skupina ($p=0,014$).

Wilcoxonov test se upotrijebio u analizi razlika omjera koncentracija CCL13 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješne terapije antikolinergicima. Testom je potvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika između tih skupina ($p=0,272$).

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija CCL13 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 23.

Tablica 23. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija CCL13 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	CCL13/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=64 $\rho=0,07$ $p=0,566$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=94 $\rho=-0,37$ $p< 0,001$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=95 $\rho=-0,10$ $p=0,351$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=91 $\rho=-0,08$ $p=0,466$
Enureza, N u 2 tjedna	N=92 $\rho=-0,07$ $p=0,539$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=83 $\rho=-0,05$ $p=0,680$

Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=81 $\rho=0,24$ p=0,030
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=60 $\rho=0,12$ p=0,373
Noćna diureza, mL	N=79 $\rho=0,25$ p=0,026
Dnevni unos tekućine, mL	N=84 $\rho=0,14$ p=0,205
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=78 $\rho=0,34$ p=0,002
Indeks hiperaktivnosti	N=57 $\rho=-0,17$ p=0,210
OABSS	N=79 $\rho=-0,22$ p=0,048
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=74 $\rho=0,21$ p=0,076
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=59 $\rho=-0,32$ p=0,015
Ispražnjeni volumen, mL	N=71 $\rho=-0,08$ p=0,537
vrijeme protoka, s	N=59 $\rho=-0,27$ p=0,041
Vrijeme pražnjenja, s	N=59 $\rho=-0,29$ p=0,026
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=59 $\rho=0,17$

	p=0,213
Rezidualni volumen, mL	N=68 $\rho=-0,08$ p=0,509
Indeks protoka	N=73 $\rho=0,21$ p=0,079
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=68 $\rho=-0,08$ p=0,499
Promjer transversalnog rektuma, cm	N=59 $\rho=-0,26$ p=0,048
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=39 $\rho=0,15$ p=0,371
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=23 $\rho=0,42$ p=0,048
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=38 $\rho=-0,05$ p=0,764
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=39 $\rho=0,19$ p=0,254
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	N=39 $\rho=-0,00$ p=0,986
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=39 $\rho=0,11$ p=0,524
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=39 $\rho=0,26$ p=0,104

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Tablica 24. prikazuje rezultate analize ROC krivulje radi utvrđivanja specifičnosti, osjetljivosti, negativnih i pozitivnih prediktivnih vrijednosti omjera koncentracija CCL13 i kreatinina u urinu.

Tablica 24. Analiza ROC krivulje (ispitanici prije terapije vs. kontrolni ispitanici)

	CCL13/kreatinin pg/mL/mmol/L
Ispitanici	N=37
Kontrolni ispitanici	N=43
Granica	> 0,39
Osjetljivost (%)	67,57 %
Specifičnost (%)	67,44 %
Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	18,70 %
Negativna prediktivna vrijednost (%)	94,90 %
Youdenov indeks	0,3501
Površina ispod krivulje	0,66
p vrijednost	p=0,011

N, broj

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.10 CXCL1

Koncentracija CXCL1 u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila < 2.22 pg/mL u 114 (70 %) uzoraka analiziranih Luminex metodom.

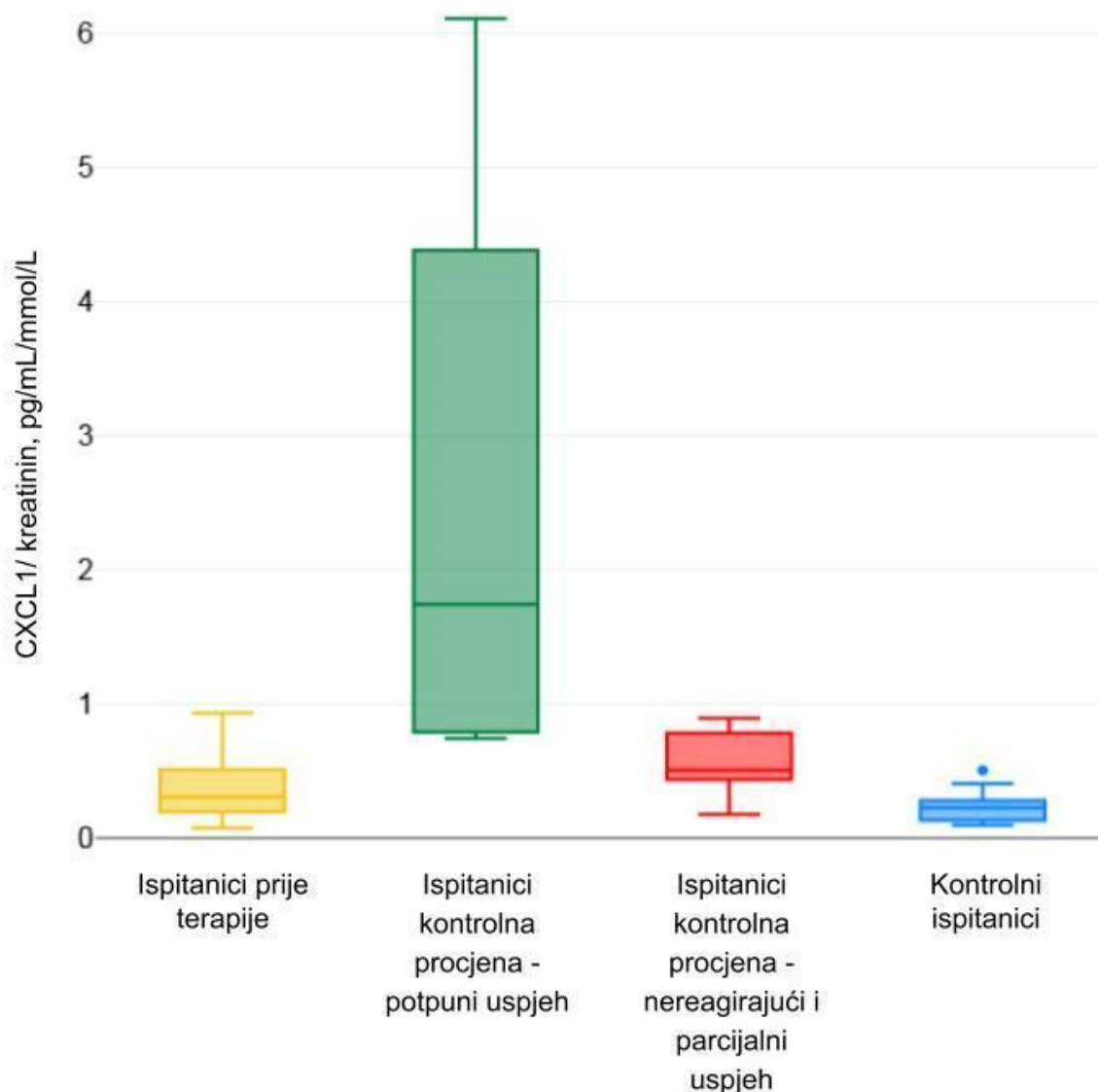
Tablica 25 predstavlja pregled omjera koncentracija CXCL1 i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 25. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija CXCL1 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
CXCL1/ kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	20 (0,42)	D=0,3634 ($p < 0,001$)	0,39 (0,21 - 0,77)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	4/21	NA	NA
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	10 (0,21)	D=0,1404 ($p > 0,10$)	NA
	Kontrolni ispitanici	16 (0,33)	D=0,2371 ($p = 0,017$)	0,23 (0,15 - 0,31)
NA,		nije		primjenjivo.

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s omjerima koncentracija CXCL1 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 10.



Slika 10. Omjeri koncentracija CXCL1 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije CXCL1 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=0,527$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između omjera udjela kvantificiranih rezultata CXCL1 i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=0,219$).

S obzirom na visoki udio rezultata ispod granice detekcije (granica detekcije Luminex metodom 2,22 pg/mL) nije provedena analiza kvantitativnim statističkim testovima, uključujući ROC analizu.

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija CXCL1 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata

slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 26.

Tablica 26. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija CXCL1 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	CXCL1/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=24 $\rho=0,45$ $p=0,027$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=33 $\rho=-0,41$ $p=0,018$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=33 $\rho=0,08$ $p=0,653$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=31 $\rho=-0,02$ $p=0,897$
Enureza, N u 2 tjedna	N=31 $\rho=-0,03$ $p=0,860$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=31 $\rho=-0,28$ $p=0,133$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=31 $\rho=0,25$ $p=0,167$
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=24 $\rho=0,55$ $p=0,006$
Noćna diureza, mL	N=31 $\rho=0,42$ $p=0,019$

Dnevni unos tekućine, mL	N=31 $\rho=-0,04$ $p=0,835$
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=30 $\rho=0,12$ $p=0,522$
Indeks hiperaktivnosti	N=27 $\rho=-0,26$ $p=0,194$
OABSS	N=29 $\rho=-0,16$ $p=0,396$
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=30 $\rho=0,11$ $p=0,560$
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=21 $\rho=-0,14$ $p=0,541$
Ispražnjeni volumen, mL	N=28 $\rho=-0,12$ $p=0,550$
Vrijeme protoka, s	N=21 $\rho=0,04$ $p=0,849$
Vrijeme pražnjenja, s	N=21 $\rho=0,06$ $p=0,806$
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=21 $\rho=0,08$ $p=0,748$
Rezidualni volumen, mL	N=28 $\rho=0,09$ $p=0,658$
Indeks protoka	N=29 $\rho=0,13$ $p=0,499$
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	

Debljina stijenke mjehura, mm	N=24 $\rho=-0,16$ $p=0,450$
Promjer transverzalnog rektuma, cm	N=22 $\rho=-0,39$ $p=0,077$
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=20 $\rho=0,40$ $p=0,078$
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=10 $\rho=-0,03$ $p=0,934$
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=20 $\rho=0,18$ $p=0,460$
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=20 $\rho=0,27$ $p=0,257$
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	N=20 $\rho=-0,26$ $p=0,278$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=20 $\rho=-0,26$ $p=0,261$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=20 $\rho=0,07$ $p=0,774$

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.11 CXCL8

Koncentracija CXCL8 u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila < 2.54 pg/mL u u 53 (32 %) uzoraka analiziranih Luminex metodom.

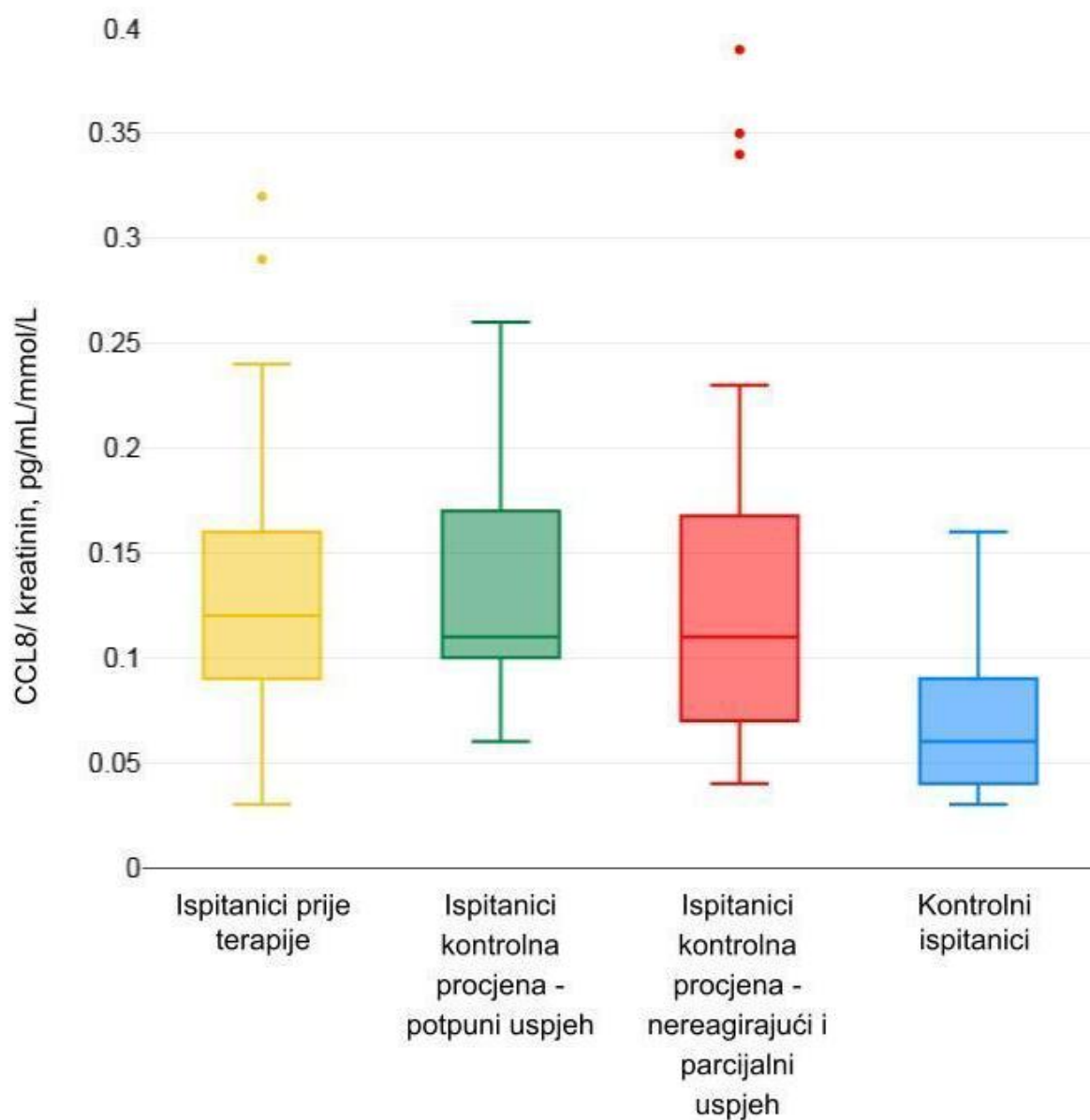
Tablica 27 predstavlja pregled omjera koncentracija CXCL8 i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 27. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija CXCL8 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
CXCL8/ kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	22 (0,46)	D=0,2006 (p=0,022)	3,14 (1,09 - 5,89)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	16/21	D=0,2965 (p< 0,001)	3,87 (3,05 - 11,95)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	43 (0,91)	D=0,2787 (p< 0,001)	3,68 (1,99 - 7,76)
	Kontrolni ispitanici	30 (0,63)	D=0,4394 (p< 0,001)	0,57 (0,33 - 1,49)

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s omjerima koncentracija CXCL8 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 11.



Slika 11. Omjeri koncentracija CXCL8 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije CXCL8 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=0,151$).

McNemarovim testom utvrđeno je kako postoji statistički značajna razlika između omjera udjela kvantificiranih rezultata CXCL8 i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=0,022$).

S obzirom na visoki udio rezultata ispod granice detekcije (granica detekcije Luminex metodom 2,54 pg/mL) nije provedena analiza kvantitativnim statističkim testovima, uključujući ROC analizu.

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija CXCL8 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 28.

Tablica 28. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija CXCL8 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Varijable	CXCL8/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=54 $\rho=0,03$ $p=0,833$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=77 $\rho=-0,10$ $p=0,413$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=78 $\rho=-0,18$ $p=0,122$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=74 $\rho=-0,22$ $p=0,055$
Enureza, N u 2 tjedna	N=75 $\rho=0,01$ $p=0,957$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=69 $\rho=-0,03$ $p=0,818$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=67 $\rho=0,15$ $p=0,218$

Prosječni volumen mokrenja, mL	N=52 $\rho=0,09$ $p=0,524$
Noćna diureza, mL	N=67 $\rho=0,33$ $p=0,007$
Dnevni unos tekućine, mL	N=69 $\rho=0,13$ $p=0,272$
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=65 $\rho=-0,04$ $p=0,736$
Indeks hiperaktivnosti	N=51 $\rho=0,02$ $p=0,901$
OABSS	N=65 $\rho=-0,17$ $p=0,179$
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=57 $\rho=0,29$ $p=0,029$
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=43 $\rho=-0,34$ $p=0,025$
Ispražnjeni volumen, mL	N=54 $\rho=0,03$ $p=0,825$
Vrijeme protoka, s	N=43 $\rho=-0,29$ $p=0,055$
Vrijeme pražnjenja, s	N=43 $\rho=-0,34$ $p=0,026$
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=43 $\rho=0,32$ $p=0,039$
Rezidualni volumen, mL	N=55 $\rho=0,02$

	p=0,909
Indeks protoka	N=56 ρ=0,27 p=0,047
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=56 ρ=0,04 p=0,796
Promjer transverzalnog rektuma, cm	N=46 ρ=-0,02 p=0,912
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=26 ρ=0,27 p=0,191
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=15 ρ=0,06 p=0,830
Bazalni tlak na detruzoru, cmH2O	N=25 ρ=0,15 p=0,475
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH2O	N=26 ρ=0,07 p=0,731
Rastezljivost, mL/cmH2O	N=25 ρ=-0,03 p=0,887
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=25 ρ=0,29 p=0,165
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=25 ρ=0,28 p=0,172

N, broj; ρ, Spearmanov koeficijent korelacije; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

4.12 CXCL10

Koncentracija CXCL10 u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika je bila kvantificirana (odnosno u mjernom rasponu 2,08 - 8500 pg/mL) u 143 (87 %) uzorka analiziranih Luminex metodom.

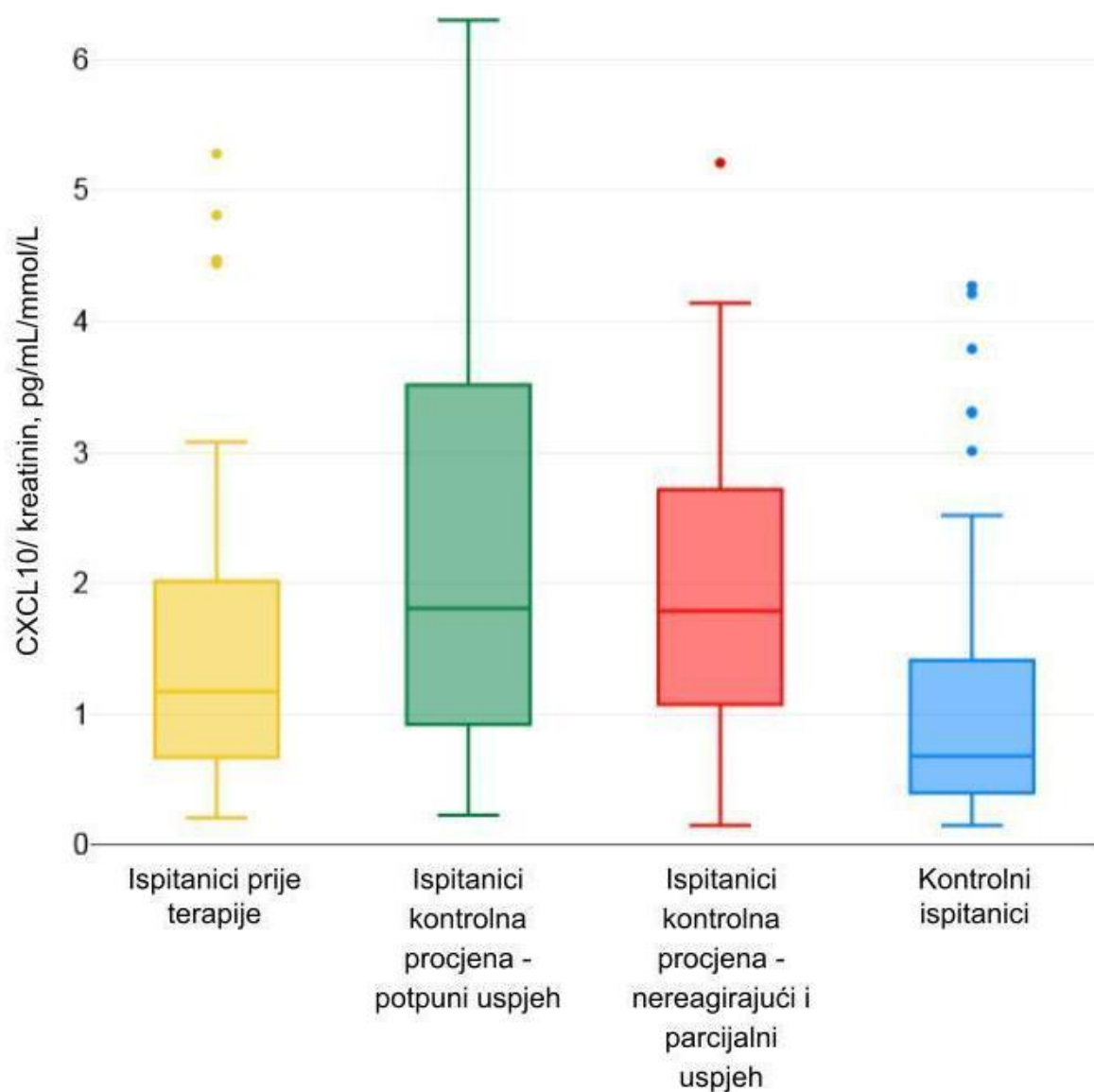
Tablica 29 predstavlja pregled omjera koncentracija CXCL10 i kreatinina u mokraći u grupama ispitanika prema metodi, rezultate Kolmogorov-Smirnov testa za provjeru normalnosti distribucije kvantificiranih rezultata i prikaz rezultata.

Tablica 29. Pregled omjera kvantificiranih koncentracija CXCL10 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika

Parametar	Skupina	Udio kvantificiranih rezultata	Kolmogorov-Smirnov test	Medijan (IQR)
CXCL10/ kreatinin, pg/mL/mmol/L	Ispitanici prije terapije	34 (0,71)	D=0,2382 (p< 0,001)	1,26 (0,68 - 2,93)
	Ispitanici kontrolna procjena - potpuni uspjeh	19/21	D=0,2419 (p=0,005)	1,83 (1,01 - 4,73)
	Ispitanici kontrolna procjena - nereagirajući i parcijalni uspjeh	45 (0,98)	D=0,2826 (p< 0,001)	1,99 (1,27 - 3,10)
	Kontrolni ispitanici	45 (0,94)	D=0,3522 (p< 0,001)	0,71 (0,41 - 2,14)

Statistički iznačajne p vrijednosti (p< 0,05) su naznačene podebljanim brojevima.

Grafikon okvira s ručicama s omjerima koncentracija CXCL10 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 12.



Slika 12. Omjer koncentracija CXCL10 i kreatinina u mokraći ispitanika i kontrolnih ispitanika.

Fisherovim testom je utvrđeno da postoji statistički značajne razlike u udjelu omjera kvantificiranih rezultata koncentracije CXCL10 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i kontrolnih ispitanika ($p=0,006$). Radi navedenog, analiza Mann-Whitney U testom i analiza ROC krivulje nisu provedene.

McNemarovim testom utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između omjera udjela kvantificiranih rezultata CXCL10 i kreatinina između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješno provedene terapije ($p=0,070$).

Wilcoxonov test se upotrijebio u analizi razlika koncentracija u omjerima koncentracija CXCL10 i kreatinina u urinu između ispitanika prije započinjanja terapije i nakon uspješne terapije antikolinergicima. Testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između skupina ($p=0,028$).

Rezultati određivanja Spearmanovog korelacijskog koeficijenta u analizi povezanosti omjera koncentracija CXCL10 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s prekomjerno aktivnim mokraćnim mjehurom prikazani su u Tablici 30.

Tablica 30. Rezultati analize povezanosti omjera koncentracija CXCL10 i kreatinina u urinu i kliničkih simptoma i rezultata slikovnih i funkcijskih testova, te urodinamike kod djece s OAB-om

Variable	CXCL10/kreatinin pg/mL/mmol/L
Dnevnik kontinencije	
Maksimalno vrijeme između mokrenja, sati	N=64 $\rho=0,09$ $p=0,482$
Hitnost, N u 2 tjedna	N=94 $\rho=-0,26$ $p=0,011$
Dnevna inkontinencija, N u 2 tjedna	N=95 $\rho=-0,04$ $p=0,693$
Nokturija, N u 2 tjedna	N=91 $\rho=-0,02$ $p=0,845$
Enureza, N u 2 tjedna	N=92 $\rho=-0,05$ $p=0,639$
48-satni dnevnik pijenja i mokrenja	
Prosječni broj mokrenja u danu	N=84 $\rho=-0,00$ $p=0,969$
Maksimalni volumen mokrenja, mL	N=83 $\rho=0,09$

	p=0,397
Prosječni volumen mokrenja, mL	N=60 $\rho=0,05$ p=0,725
Noćna diureza, mL	N=81 $\rho=0,06$ p=0,626
Dnevni unos tekućine, mL	N=84 $\rho=0,01$ p=0,913
Dnevni unos tekućine po kg, mL	N=78 $\rho=0,17$ p=0,143
Indeks hiperaktivnosti	N=60 $\rho=-0,23$ p=0,081
OABSS	N=80 $\rho=-0,13$ p=0,256
Mikciometrija	
Maksimalna brzina protoka, mL/s	N=73 $\rho=-0,06$ p=0,628
Vrijeme do maksimalne brzine protoka, s	N=56 $\rho=0,02$ p=0,903
Ispražnjeni volumen, mL	N=70 $\rho=-0,14$ p=0,266
vrijeme protoka, s	N=56 $\rho=-0,10$ p=0,451
Vrijeme pražnjenja, s	N=56 $\rho=-0,13$ p=0,351
Prosječna brzina protoka, mL/s	N=56 $\rho=-0,05$ p=0,715
Rezidualni volumen, mL	N=67

	$\rho=-0,02$ $p=0,851$
Indeks protoka	N=72 $\rho=0,02$ $p=0,892$
Ultrazvuk mokraćnog mjehura	
Debljina stijenke mjehura, mm	N=68 $\rho=-0,06$ $p=0,620$
Promjer transverzalnog rektuma, cm	N=57 $\rho=-0,33$ $p=0,012$
Urodinamsko ispitivanje	
Broj neinhibiranih kontrakcija	N=38 $\rho=0,23$ $p=0,159$
Volumen punjenja 1. kontrakcije, mL	N=21 $\rho=0,02$ $p=0,924$
Bazalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=37 $\rho=0,39$ $p=0,017$
Maksimalni tlak na detruzoru, cmH ₂ O	N=38 $\rho=0,34$ $p=0,038$
Rastezljivost, mL/cmH ₂ O	N=37 $\rho=-0,15$ $p=0,366$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura, mL	N=37 $\rho=-0,18$ $p=0,289$
Maksimalni cistometrijski kapacitet mjehura/procijenjeni kapacitet mokraćnog mjehura za dob, %	N=37 $\rho=0,13$ $p=0,454$

N, broj; ρ , Spearmanov koeficijent korelacije; OABSS (engl. *overactive bladder symptom score*).

Statistički iznačajne p vrijednosti ($p < 0,05$) su naznačene podebljanim brojevima.

5. Rasprava

Hitnost, neodgodivi poriv za mokrenjem, nužan je simptom za uspostavljanje dijagnoze OAB-a, no podložna je subjektivnoj interpretaciji ispitanika (81). Roditeljima je najteže prijaviti prisustvo hitnosti, za razliku od objektivnih tegoba poput bijega mokraćne, nokturije ili učestalog mokrenja. Liječnici stoga često ne mogu samo na temelju anamneze i 48-satnog dnevnika pijenja i mokrenja (koji je temelj dijagnostike funkcionalnih poremećaja mokraćnog mjehura), pouzdano i objektivno procijeniti prisustvo i opseg hitnosti. Prema Međunarodnom društvu za dječju kontinenciju, dijagnoza prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura se postavlja u djeteta i adolescenta koji ima simptome hitnosti minimalno jedanput tjedno u zadnja tri mjeseca, s ili bez inkontinencije, učestalog mokrenja ili nokturije, u izostanku infekcije mokraćnih putova (7). Radi bolje objektivizacije tegoba, liječnici i uroterapeuti redovito upotrebljavaju standardizirane i validirane skale, poput OABSS upitnika, ili matematičke indekse poput OI (10, 11).

Iako neka istraživanja ističu kako urodinamska ispitivanja imaju nisku osjetljivost i kako se kod nekih pacijenata uočavaju nepredvidivi obrasci, druga istraživanja u pedijatrijskoj populaciji su pokazala kako ona mogu predvidjeti kad će standardne mjere uroterapije biti nedovoljne te da je nužno uvođenje terapije antikolinergicima (82 - 84). Prema trenutačnim smjernicama, urodinamsko ispitivanje nije nužno za postavljanje dijagnoze i uvođenje farmakoterapije u pacijenata s OAB-om te smjernice Europskog društva za pedijatrijsku urologiju (ESPU, engl. *European Society for Paediatric Urology*) preporučuju urodinamska ispitivanja ispitanicima koji nisu reagirali na terapiju antikolinergicima (20). Pronalazak objektivnog, neinvazivnog biljega za dijagnozu i praćenje uspješnosti terapije OAB-a bio bi od velikog značaja, posebice za dječju populaciju (85).

U ovom istraživanju, analizirane su razlike u omjeru koncentracija dvanaest analita i kreatinina u urinu ispitanika prije započinjanja terapije antikolinergicima i kontrolnih ispitanika, te razlike između ispitanika prije započinjanja i nakon provedene terapije antikolinergicima s potvrđenim kliničkim uspjehom. Za osam analita (BDNF, NGF, IL-1 α , IL-6, CCL7, CCL8, CXCL1 i CXCL8), izmjerene koncentracije bile su ispod detekcijskog raspona u ≥ 70 % analiziranih uzoraka, stoga ovo istraživanje ne podržava njihovo rutinsko korištenje u smislu dijagnostičkih biljega ili biljega praćenja uspješnosti terapije kod djece s OAB-om.

5.1 Dijagnostički biljezi

Kao potencijalni dijagnostički biljezi OAB-a u ovom se istraživanju ističu tri citokina - IL-1RA, CCL2 i CCL13.

IL-1RA analit je koji je bio kvantificiran u 99 % uzoraka analiziranih Luminex metodom. Rezultat Mann-Whitney U testa je pokazao kako je omjer koncentracija IL-1RA i kreatinina u urinu ispitanika s OAB-om prije početka terapije statistički značajno viša u odnosu na one u urinu kontrolnih ispitanika (803 (382,77 - 1983,68) pg/mL/mmol/L vs. 193 (101,43 - 399,56) pg/mL/mmol/L, $p < 0,001$).

ROC analiza definirala je optimalnu graničnu vrijednost za dijagnozu OAB-a kao IL-1RA/kreatinin $> 367,11$ pg/mL/mmol/L kreatinina, uz osjetljivost 78,72 % i specifičnost 74,47 %, što doprinosi potencijalu ovog analita kao dijagnostičkog biomarkera. Treba naglasiti i izvrsnu sposobnost isključivanja bolesti (NPV=96,9 %), prema kojoj bi samo 3,1 % pacijenata imalo OAB unatoč negativnom rezultatu.

CCL2 je bilo moguće kvantificirati u 100 % uzoraka analiziranih Luminex metodom. Rezultat Mann-Whitney U testa je pokazao kako je omjer koncentracija urinarnog CCL2 i kreatinina u urinu ispitanika s OAB-om prije početka terapije statistički značajno viša u odnosu na onu u urinu kontrolnih ispitanika (28,49 (15,50 - 47,95) pg/mL/mmol/L vs. 19,08 (10,77 - 25,70) pg/mL/mmol/L, $p=0,011$).

ROC analiza definirala je optimalnu graničnu vrijednost za dijagnozu OAB-a kao CCL2/kreatinin $> 26,15$ pg/mL/mmol/L, uz osjetljivost 54,17 % i specifičnost 77,08 % te NPV=93,8 %. CCL2 stoga može imati vrijednost za isključivanje bolesti, ali niža osjetljivost sugerira da bi mogao biti korisniji u kombinaciji s drugim markerima nego kao samostalni dijagnostički biljeg.

CCL13 analit je koji je bio kvantificiran u 86 % uzoraka analiziranih Luminex metodom. Rezultat Mann-Whitney U testa je pokazao kako je omjer koncentracija urinarnog CCL13 i kreatinina u urinu ispitanika s OAB-om prije početka terapije statistički značajno viša u odnosu na one u urinu kontrolnih ispitanika (0,61 (0,29 - 1,03) pg/mL/mmol/L vs. 0,32 (0,21 - 0,59) pg/mL/mmol/L, $p=0,014$).

ROC analiza definirala je optimalnu graničnu vrijednost za dijagnozu OAB-a kao CCL13/kreatinin $> 0,39$ pg/mL/mmol/L, uz osjetljivost 67,57 % i specifičnost 67,44 %. Uravnotežene osjetljivost i specifičnost te izvrsna negativna prediktivna vrijednost (NPV=94,90 %), što sugerira da bi mogao biti koristan za isključivanje bolesti, posebice uz druge markere.

Kao što je prethodno navedeno, malen je broj istraživanja koja su ispitivala potencijalnu ulogu citokina u dijagnostici OAB-a, a sva su provedena među odraslom populacijom. Rezultati ovog rada većinom su u skladu s objavljenima, uz određene razlike.

U slučaju CCL2, rezultati se slažu s onima Farhana i sur. u kojem su također prijavljene viši omjeri tog analita i kreatinina u urinu u ispitanika s OAB-om u odnosu na zdrave kontrole (76). Slično su objavili i drugi istraživački timovi, što povećava vjerojatnost povezanosti CCL2 i OAB-a, nevezano uz metodu, čak i kad nije provedena normalizacija kreatininom (77, 86, 87).

CCL13 je ispitan u istraživanju Ghoniema i sur. koristeći proteomiku na čipu, a rezultati su u skladu s rezultatima ovog istraživanja (77).

Nasuprot tome, rezultati za IL-1RA su bili varijabilniji. Dok je u ovom istraživanju primijećeno značajno povećanje IL-1RA kod pacijenata s OAB-om, većina drugih studija nije prijavila razliku, a Tyagi i sur. su 2010. čak otkrili niže koncentracije kod pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike (77, 78, 86, 87). Treba naglasiti kako se nije u svim istraživanjima provela normalizacija koncentracija analita po kreatininu u urinu, što sugerira da bi normalizacija mogla biti bitna za otkrivanje suptilnih promjena u markerima (77, 78, 86). Ovi rezultati stoga mogu odražavati fiziološke razlike koje bi inače bile prikrivene promjenjivom koncentracijom urina. Normalizacija koncentracija analita u urinu prema koncentraciji kreatinina u urinu pomaže u sprječavanju lažno povišenih ili lažno sniženih vrijednosti, u ovisnosti o ukoncentriranosti mokraće.

Jedan od čimbenika koji doprinosi varijabilnosti između studija jest izbor testa, koji može uvelike utjecati na kvantifikaciju biomarkera. Iako su i ELISA i Luminex i proteomika na čipu sve imunokemijske metode, razlikuju se u nekoliko aspekata, uključujući osjetljivost, specifičnost, raspon detekcije i kinetiku vezanja antitijela i antigena.

Luminex testovi, poput onog korištenog u ovom istraživanju, koriste multipleks tehnologiju temeljenu na kuglicama, što omogućuje istovremeno mjerenje koncentracija više analita u jednom uzorku. Iako je ovaj pristup učinkovit i prikladan za detekciju citokina, osjetljivost metode može varirati između analita, kao i proizvođača. ELISA je, s druge strane, metoda koja nudi visoke analitičke osjetljivosti i specifičnosti za pojedinačne biomarkere, ali nema sposobnost Luminexa za visoku propusnost. Nadalje, proteomika temeljena na čipu (kao što su koristili Ghoniem i sur.) često se oslanja na polukvantitativnu detekciju višestrukih proteina, što možda nije izravno

usporedivo s Luminexom ili ELISA-om zbog razlika u gustoći antitijela, dostupnosti epitopa i pragovima detekcije (77).

Ove metodološke razlike mogu dovesti do kvantitativnih odstupanja, posebno kada se procjenjuju proteini niskih koncentracija poput citokina. Na primjer, analit koji se čini nepromijenjen korištenjem jedne platforme može pokazati značajne varijacije na drugoj, ne zbog bioloških razlika, već zbog granica detekcije specifičnih za analizu ili razlika u kalibraciji. Primjerice, u usporedbi dviju Luminex platformi Khan i sur. su pokazali kako čak i kad analiti pokazuju slične obrasce u usporedbama različitih proizvođača, njihove apsolutne koncentracije mogu biti različite (88). Stoga se svaka usporedba koncentracija biomarkera između studija mora tumačiti oprezno, osobito kada se koriste različite imunokemijske metode.

Osim tehničke varijabilnosti, način statističke obrade i izvještavanja o njoj također su izvor razlika između istraživanja. U ovom je istraživanju testirana normalnost distribucije podataka, u skupinama gdje distribucija nije bila normalna podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon), a shodno tome su korišteni neparametrijski statistički testovi. Ovaj pristup točnije odražava središnju tendenciju i disperziju iskrivljenih podataka. Nasuprot tome, u većini ovih članaka podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ srednja vrijednost standardne pogreške (SEM, engl. *standard error mean*) ili kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD), unatoč tome što nisu testirane niti prijavljene normalnosti distribucije podataka (76, 77, 86, 87). To može podcijeniti varijabilnost i pogrešno predstaviti stvarni raspon podataka, osobito kada su vrijednosti iskrivljene ili sadrže odstupanja. Nadalje, korištenje SEM umjesto SD može stvoriti pogrešan dojam preciznosti, osobito u malim uzorcima. Ove razlike u rukovanju podacima mogu pridonijeti opisanim nedosljednostima među studijama, čak i kada biološki trendovi u pozadini mogu biti slični.

Jedno važno metodološko pitanje javlja se u istraživanju Jianga i sur. koje prikazuje koncentracije biomarkera kao srednju vrijednost $\pm$ SD, čak i kad su srednje vrijednosti za određene analite ispod granice detekcije (LOD, engl. *limit of detection*) koju je odredio proizvođač (86). Iako su autori naveli kako ti analiti nisu dalje statistički obrađivani, javlja se pitanje koji je udio nemjerljivih rezultata bio prisutan za druge analite. Ovaj pristup izaziva zabrinutost u pogledu interpretabilnosti i pouzdanosti podataka, budući da se vrijednosti ispod LOD-a po definiciji ne mogu kvantificirati s prihvatljivom točnošću. Prikaz takvih rezultata kao brojčanih vrijednosti umjesto $<LOD$ ne samo da unosi nesigurnost, već također riskira napuhavanje prividne preciznosti

rezultata, posebno kada se standardna odstupanja izračunavaju na procjenama s velikom varijabilnošću.

U takvim bi slučajevima bilo prikladnije ili isključiti vrijednosti ispod LOD-a iz deskriptivne statistike ili koristiti tehnike rukovanja cenzuriranim podacima, kao što je izvješćivanje o postotku uzoraka ispod LOD-a i pravilan prikaz podataka. Autori bi trebali izvijestiti o udjelu nemjerljivih vrijednosti, razjasniti svoje postupanje s tim mjerenjima i razmotriti kako bi ona mogla utjecati na promatrane trendove. Ukoliko se to ne provede pravilno, može doći do pogrešnih zaključaka, posebno kad se uspoređuju skupine s značajnim udjelom biljega koji nisu mjerljivi. Ovo je osobito važno u istraživanju biomarkera, gdje zaključci mogu ovisiti o suptilnim razlikama u koncentracijama analita među skupinama.

Usporedbe s objavljenim studijama naglašavaju važnost tehničke i statističke strogosti u istraživanjima urinarnih biokemijskih biljega. Normalizacija koncentracija analita kreatininom u urinu i odgovarajuća prikaz podataka i izbor statističkih testova kritični su za točnu interpretaciju, posebno kada se radi o citokinima koji su prisutni u niskim koncentracijama ili su skloni interindividualnim varijabilnostima.

Ovo istraživanje sugerira kako bi IL-1RA mogao imati značajniju ulogu u patofiziologiji bolesti nego što se dosad priznavalo i naglašavaju potrebu za standardiziranim metodama u istraživanju biomarkera.

Uočeno povišenje CCL2, CCL13 i IL-1RA u bolesnika s OAB-om ukazuje na aktivnu ulogu imunološkog signaliziranja i upale u patofiziologiji ovog stanja. Dok se OAB tradicionalno smatra funkcionalnim poremećajem mokraćnog mjehura kojeg karakterizira hitnost, učestalost i inkontinencija, sve više dokaza podupire uključenost kronične nebakterijske upale, osobito u urotelu i suburotelnom prostoru.

CCL2 je kemokin poznat po svojoj ulozi u regrutiranju monocita, memorijskih T stanica i dendritičnih stanica na mjesta ozljede tkiva ili upale (64). Njegova pojačana regulacija u pacijenata s OAB-om može odražavati kontinuirano regrutiranje mononuklearnih stanica u stijenku mokraćnog mjehura, potencijalno pridonoseći neuroimunim interakcijama koje senzibiliziraju aferentne živce i pogoršavaju simptome hitnosti. Dodatno, CCL2 je uključen u regulaciju funkcije urotelne barijere koja može biti važna u patofiziologiji OAB-a (89) .

Signalizacija CCL2 putem C-C kemokin receptor tipa 2 (CCR2, engl. *C-C chemokine receptor 2*) igra aktivnu, funkcionalnu ulogu u modulaciji senzornih putova mokraćnog mjehura tijekom disfunkcije mokraćnog mjehura izazvane upalom. Eksperimentalno

istraživanje na štakorima pokazalo je kako lokalna upala (cistitis izazvan ciklofosfamidom) dovodi do pojačane regulacije CCR2 u urotelu i neuronima dorzalnog korijenskog ganglija povezanih s mjehurom, kako povećana aktivnost CCL2 doprinosi povećanoj učestalosti mokrenja i povećanoj somatskoj osjetljivosti, a kako se antagonistima CCR2 simptomi ublažavaju (smanjena hitnost, povećan kapacitet mokraćnog mjehura) (90).

Ovi nalazi sugeriraju da CCL2 nije samo marker upale, već i aktivni medijator senzorne hiperekscitabilnosti u aferentnom dijelu refleksa mokrenja. Ovo podupire hipotezu da povišeni urinarni CCL2 u bolesnika s OAB odražava više od samo pasivne imunološke aktivacije — može ukazivati na funkcionalno relevantnu neuroimunu interakciju koja pokreće hitnost i pretjeranu aktivnost mokraćnog mjehura.

Iako se CCL13 rjeđe proučava u kontekstu disfunkcije mokraćnog mjehura, također igra ulogu u regrutiranju monocita, eozinofila i limfocita kroz njegovu interakciju s višestrukim kemokinskim receptorima, uključujući CCR2 i C-C kemokin receptor tipa 5 (CCR5, engl. *C-C chemokine receptor 5*). Povišenje CCL13 može predstavljati širu imunološku aktivaciju koja uključuje ne samo monocite, već i eozinofilne odgovore ili odgovore tipa Th2, koji su povezani s određenim upalnim stanjima mjehura (91, 92). S druge strane, monociti sudjeluju u cijeljenju tkiva, odstranjivanju patogena i mrtvih stanica i pokretanju stečenog imuniteta. Međutim, regrutirani monociti također mogu pridonijeti patogenezi infekcije i kronične upalne bolesti (93).

U ovom istraživanju, porast i CCL2 i CCL13 u urinu pacijenata s OAB-om može odražavati tu istu aktivaciju signalnih putova posredovanih kemokinom u mokraćnom mjehuru. CCL13, koji se također veže na CCR2 [kao i C-C kemokin receptor tipa 3 (CCR3, engl. *C-C chemokine receptor 3*) i CCR5], može djelovati sinergistički ili redundantno s CCL2, potencijalno pojačavajući regrutaciju imunoloških stanica i pridonoseći senzibilizaciji aferentnog živca.

Zajedno, ovi nalazi podržavaju koncept neuroupalne komponente u OAB, gdje kemokini kao što su CCL2 i CCL13 moduliraju ekscitabilnost senzornih živaca, potencijalno kroz njihove interakcije s urotelnim stanicama mokraćnog mjehura, lokalnim imunološkim stanicama i senzornim neuronima koji inerviraju mokraćni mjehur. Stoga, povišeni urinarni CCL2 i CCL13 u bolesnika s OAB-om ne mogu služiti samo kao biomarkeri upale, već i kao neizravni pokazatelji patološkog aferentnog signaliziranja, pridonoseći simptomima kao što su hitnost, učestalost i nelagoda u zdjelici. Ova otkrića jačaju obrazloženje za ciljanje putova kemokina kao što je

CCL2/CCR2 u budućim terapijskim pristupima usmjerenim na modulaciju senzornog unosa u OAB.

IL-1RA se izlučuje u brojnim upalnim bolestima, a ravnoteža između koncentracije proupalnog citokina IL-1 i njegovog protuupalnog receptorskog antagonista IL-1RA može biti ključna u razvoju bolesti. Pretpostavlja se kako IL-1RA doprinosi ograničenju težine bolesti, no kako može biti nedovoljan za zaustavljanje snažne akutne upale (94). Njegov porast u bolesnika s OAB-om mogao bi predstavljati kompenzacijski odgovor na tekuću upalu, s ciljem ublažavanja oštećenja tkiva i kontrole upalne kaskade. Povećane razine IL-1RA mogu sugerirati prisutnost imunoloških homeostatskih mehanizama koji pokušavaju uravnotežiti upalnu signalizaciju potaknutu citokinima obitelji IL-1, za koje se zna da sudjeluju u ozljedi urotela i senzibilizaciji aferentnog živca.

Istodobni porast CCL2, CCL13 i IL-1RA podupire hipotezu da je u patofiziologiji OAB uključena složena interakcija proupalnih i protuupalnih imunoloških mehanizama. Ovi rezultati su u skladu s kroničnim, neinfektivnim upalnim stanjem, koje može pridonijeti i strukturnim i senzornim promjenama u mjehuru. To naglašava potencijalnu korisnost urinarnih upalnih markera u daljnjem razumijevanju patofiziologije OAB te bi moglo poduprijeti buduće napore prema dijagnostici ili stratifikaciji liječenja vođenoj biomarkerima.

Identificirane slabe statistički značajne povezanosti između omjera koncentracija IL1RA, CCL2 i CCL13 i kreatinina u urinu i različitih kliničkih i funkcionalnih parametara korisne su za bolje razumijevanje patofiziologije OAB-a kod djece. Iako same po sebi nisu dovoljne za postavljanje dijagnoze na temelju ovih biomarkera, ove povezanosti imaju važne implikacije. Slaba, ali statistički značajna povezanost između omjera koncentracija CCL13 i kliničkih parametara, poput učestalosti hitnosti i noćne diureze, te povezanost CCL2 s cistometrijskim kapacitetom, podržavaju njihovu koristnost u dijagnostici OAB-a. Pozitivne i negativne povezanosti između biomarkera i mjera kapaciteta mokraćnog mjehura, mikcijskih parametara te simptoma ukazuju na to da upalni procesi mogu biti povezani s funkcionalnim promjenama u donjem urinarnom traktu kod djece s OAB-om. To podupire hipotezu da imunološki mehanizmi igraju ulogu u nastanku i razvoju simptoma OAB-a.

5.2 Biljezi praćenja uspješnosti terapije

Kao biljeg praćenja uspješnosti terapije OAB-a pokazao se CXCL10 koji je bio kvantificiran u 87 % uzoraka analiziranih Luminex metodom. Wilcoxonov test je pokazao statistički značajno nižu razinu omjera koncentracija CXCL10 i kreatinina u urinu ispitanika prije započinjanja terapije nego nakon uspješne terapije antikolinergicima (1,26 (0,68 - 2,93) pg/mL/mmol/L vs. 1,83 (1,01 - 4,73) pg/mL/mmol/L, $p=0,028$).

Povišenje omjera koncentracija CXCL10 i kreatinina u mokraći kod pacijenata nakon uspješne terapije za OAB, u usporedbi s razinama izmjerenim prije liječenja neočekivan je, ali zanimljiv rezultat ovog istraživanja. Na prvi pogled, ovo se može činiti kontraintuitivnim, budući da je CXCL10 kemokin koji se obično povezuje s upalnim procesima i inducira ga interferon- γ tijekom imunološke aktivacije (74). Međutim, ovo opažanje može ukazati na složeniju ulogu CXCL10 u rješavanju i regulaciji upale mjehura. Prvo, važno je uzeti u obzir da CXCL10, iako se obično povezuje s upalom, također može sudjelovati u imunološkoj rezoluciji i oporavku tkiva. Nakon suzbijanja očite upale i simptomatskog olakšanja terapijom, mokraćni mjehur može ući u fazu imunološke modulacije, u kojoj određeni kemokini ostaju povišeni ili im se izlučivanje povećava za vrijeme procesa popravka tkiva ili imunološkog nadzora. CXCL10 privlači T stanice pozitivne na kemokinski receptor CXC motiva 3 (CXCR3, engl. *C-X-C motif chemokine receptor 3*) i NK stanice, koje mogu pridonijeti ne samo uklanjanju patogena već i sprječavanju povratka infekcije (95). Povećanje CXCL10 nakon terapije moglo bi odražavati kompenzacijski ili regulatorni imunološki odgovor. Moduliranje jedne komponente imunološkog sustava - poput antikolinergičke terapije ili biheviornalnih intervencija - može pomaknuti ravnotežu ekspresije citokina dok tijelo ponovno prilagođava imunološki status. U tom kontekstu, CXCL10 može djelovati kao homeostatski signal, uključen u prijelaz iz proupalnog u regulirano ili protuupalno stanje. Ova opažanja sugeriraju kako povećani CXCL10 nakon terapije ne odražava nužno trajnu upalu, već umjesto toga može predstavljati prolazan, fiziološki odgovor povezan s imunološkom regulacijom i oporavkom tkiva. Potrebne su daljnje longitudinalne studije s produljenim praćenjem kako bi se razjasnilo je li ovo povećanje trajno i je li u korelaciji s dugoročnim terapijskim ishodima.

Rezultati analize povezanosti koji sugeriraju da više razine CXCL10 u urinu mogu biti povezane s manje epizoda hitnosti i smanjenom distenzijom rektuma potencijalno odražavaju poboljšanje funkcije mjehura i crijeva. To je u skladu s uočenim porastom omjerom koncentracije CXCL10 i kreatinina u urinu nakon uspješne terapije, što implicira da CXCL10 ne mora biti samo marker upale, već također može odražavati pomak u imunološkom statusu ili prilagodbi tkiva nakon liječenja.

Wilcoxonovim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u rezultatima između uzoraka ispitanika prije i po uspješno provedenoj terapiji antikolinergicima za IL1RA ($p=0,765$), CCL2 ($p=0,079$) niti CCL13 ($p=0,272$), stoga se ne podržava njihovo korištenje kao biljega uspješnosti praćenja terapije.

U objašnjavanju nepostojanja statistički značajne razlike u koncentracijama ovih analita prije i nakon uspješnog liječenja antikolinergikom svakako treba u obzir uzeti kratak period praćenja ispitanika (3 odnosno 6 mjeseci). Može se pretpostaviti kako je period od 6 mjeseci prekratak za potpuno smirenje kronične upale stijenke mokraćnog mjehura, za koju pretpostavljamo da je prisutna obzirom na povišene proupalne citokine, a što je hipoteza i ranijih istraživanjima (57). Buduće studije bi trebale pratiti koncentracije tih analita kod pacijenata koji su ostali u potpunoj remisiji nakon godinu dana od uvođenja terapije i/ili godinu dana od postizanja potpune remisije. Također, klinički bi vjerojatno trebalo razmotriti primjenu kontinuirane antibakterijske profilakse kao terapijske opcije u smislu protuupalnog učinka. Provjeru ove hipoteze moguće je provesti jedino putem odgovarajući dizajnirane kliničke studije.

5.3 Nemjerljivi analiti

U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika između omjera koncentracija BDNF-a i NGF-a i kreatinina u urinu ispitanika prije započinjanja terapije antikolinergikom i kontrolnih ispitanika, kao niti ispitanika prije započinjanja i nakon uspješno provedene terapije antikolinergicima. Štoviše, izmjerene koncentracije ovih analita su bile ispod detekcijskog raspona u 91 % i 74 % uzoraka za BDNF te 96 % i 100 % za NGF, ovisno koja analitička metoda je upotrebljena (ELISA ili Luminex).

Ti rezultati nisu u skladu s većinom dosad provedenih istraživanja (4, 31, 39, 44-53, 96, 97). Međutim, iako su višestruka istraživanja pokazala kako pacijenti s OAB imaju značajno više koncentracije BDNF i NGF u urinu, nekoliko skorašnjih istraživanja

objavljenih u periodu 2017. - 2020. je pokazalo oprečne rezultate. S jedne strane, neke nisu pronašle statistički značajne razlike u omjerima koncentracija urinarnog NGF i kreatinina između skupine pacijenata s OAB i kontrolne skupine (96, 98). Druga istraživanja su pokazala nemjerljivo niske koncentracije NGF u urinu koristeći razne komercijalno dostupne ELISA testove (54, 99, 100). Ovakve razlike u rezultatima ukazale su na važnost korištenja različitih metoda kako bi se utvrdili optimalni postupci za detekciju biokemijskih biljega u urinu. Metaanaliza o istraživanju korištenja koncentracije urinarnog NGF-a kao biokemijskog biljega prekomjerno aktivnog detruzora iz 2019. navodi kako on jest potencijalni neinvazivni biljeg, no ističe kako su potrebna dodatna klinička istraživanja kako bi se ta pretpostavka potvrdila (55).

Postoji nekoliko čimbenika koji se moraju uzeti u obzir za pravilnu interpretaciju navedenih rezultata. Jedan od najvažnijih je ograničena osjetljivost trenutačno komercijalno dostupnih ELISA testova za određivanje koncentracija BDNF-a i NGF-a. U svom pismu uredniku u vezi metaanalize o korisnosti urinarnog NGF-a kao biomarkera OAB-a, Gamper i Viereck naglašavaju kako su mnoga istraživanja koristila ELISA testove tvrtke Promega (Promega, Madison, SAD) za koje se naknadno pokazalo kako kvantificiraju komponente urina koje nisu NGF (odnosno daju lažno pozitivne rezultate) te su stoga povučeni s tržišta (101). U svom pismu su se također referirali i na dva prethodno spomenuta istraživanja u kojima su koncentracije NGF-a u urinu bile ispod granice osjetljivosti metode (99, 100).

Budući da korišteni Luminex i ELISA testovi za NGF imaju slične detekcijske raspone, ne iznenađuje što su polučili slične rezultate. Kako je kvantifikacijski limit za koncentraciju BDNF-a niži, postojala je mogućnost kvantifikacije proteina u većem broju uzoraka. Međutim, u ovom istraživanju samo 43 (26 %) uzorka su imala koncentraciju višu od analitičke osjetljivosti metode stoga je jasno kako niti Luminex testovi nisu dovoljno osjetljivi za mjerenje BDNF-a kao urinarnog biokemijskog biljega OAB-a u djece.

U posljednjih nekoliko desetljeća, istraživanju uloge neurotrofina u patofiziologiju, dijagnosticiranju i praćenju terapije OAB-a posvećeno je mnogo vremena i truda, međutim oni još nisu uključeni u algoritme dijagnoze niti praćenja terapije OAB-a. Jedna od mogućnosti kako to postići je razviti imunokemijske testove s nižim limitom detekcije koji će biti primjereniji za korištenje za analizu proteina u uzorcima urina. Primjer takve metode je prethodno spomenuta metoda koju su koristili Ghoniem et al.

koji su razvili protokol prema kojem se prije analize urina proteini iz alikvota uzorka precipitiraju i potom otope u puferu nakon čega im se određuje koncentracija analizom na specifičnim membranama imunokemiluminiscentnom metodom (77). Druga mogućnost je korištenje osjetljivije metode poput tandem masene spektrometrije. Međutim, budući da je krajnji cilj određivanja novih biljega da se mogu jednostavno i povoljno odrediti, metode koje su skupe i zahtjevne za korištenje nisu od interesa. Uzevši u obzir lažno pozitivne rezultate u nekim studijama, kao i istraživanja u kojima se, poput u ovom radu, neurotrofini nisu mogli kvantificirati, postoji mogućnost kako neurotrofini zapravo nisu pouzdani biljezi OAB-a. Stoga, znanstvena bi se zajednica trebala okrenuti ka istraživanju novih ciljnih proteina, poput citokina i kemokina.

U ovom istraživanju, više citokina nije bilo moguće kvantificirati u značajnom udjelu uzoraka s pomoću Luminex metode, unatoč poznatoj ulozi u upalnim procesima. Koncentracije IL-1 α , IL-6, CCL7, CCL8, CXCL1 i CXCL8 bile su ispod granice kvantifikacije metode u > 70 % uzoraka (kvantifikacija uspješna u 47 % za IL-1 α , 4 % za IL-6, 51 % za CCL7, 64 % za CCL8, 30 % za CXCL1 i 68 % za CXCL8). Stoga rezultati ovog istraživanja ne podržavaju korištenje navedenih analita kao pouzdanih dijagnostičkih biljega niti biljega praćenja terapije kod djece s OAB-om.

Navedeni rezultati djelomično se razlikuju od prethodnih istraživanja, posebice studije Ghoniema i sur., koji nisu izvijestili o problemima kvantifikacije navedenih citokina. Razlike se mogu objasniti metodološkim razlikama — primjerice, korištenje membranskih protein čipova s kemiluminiscentnim očitavanjem u spomenutom radu u odnosu na Luminex tehnologiju korištenu u ovom istraživanju, te neprijavlivanje granica detekcije i kvantifikacije u prethodnim studijama (77, 78, 86, 97, 94).

Usporedbom s literaturom, koncentracije IL-6 prijavljene u drugim radovima (npr. Yu i sur., Jiang i sur.) bile su ispod granice kvantifikacije naše metode (12,86 pg/mL), što dodatno potvrđuje važnost osjetljivosti korištene analitičke platforme i nužnost opreza pri interpretaciji podataka bez jasno navedenih detekcijskih granica (86, 97).

Unatoč ograničenoj kvantifikaciji, pojedini analiti (posebno CCL7, CXCL1 i CXCL8) pokazali su statistički značajne povezanosti s klinički relevantnim parametrima OAB-a. Primjerice CCL7 je pokazao slabe pozitivne korelacije s parametrima iz 48-satnog dnevnika (maksimalni volumen mokrenja, noćna diureza, dnevni unos tekućine) te umjerenu do dobru povezanost s omjerom maksimalnog cistometrijskog kapaciteta mjehura i procijenjenog kapaciteta za dob. CXCL1 je pokazao negativnu povezanost s brojem hitnosti, te pozitivne povezanosti s maksimalnim vremenom između

mokrenja, noćnom diurezom i prosječnim volumenom mokrenja — mjere koje Europska agencija za lijekove (EMA, engl. *European Medicines Agency*) preporučuje kao primarne ishode u evaluaciji terapije OAB-a kod djece (102). CXCL8 je korelirao s parametrima mikciometrije (maksimalna i prosječna brzina protoka, indeks protoka), kao i s noćnom diurezom te negativno s vremenom do postizanja maksimalne brzine protoka i vremenom pražnjenja.

Ove povezanosti, iako slabe, upućuju na potencijalnu biološku relevantnost pojedinih citokina u patofiziologiji OAB-a. Međutim, zbog tehničkih ograničenja u kvantifikaciji s pomoću Luminex metode, njihova klinička korisnost ostaje upitna i zahtijeva daljnju potvrdu korištenjem osjetljivijih analitičkih metoda s nižim pragom kvantifikacije.

5.4 Predanalitički čimbenici

U traženju mogućeg uzroka niskih udjela kvantificiranih analita, u obzir treba uzeti i predanalitički proces od uzorkovanja urina do analize proteina imunokemijskim metodama.

Urin je praktičan uzorak za biokemijske biljege budući da je njegovo prikupljanje neinvazivno u odnosu na uzorkovanje krvi, a osim toga može se prikupljati opetovano u većim količinama bez rizika za pacijenta (103).

Jedan od potencijalnih uzroka niskih koncentracija proteina od interesa je njihova razgradnja endogenim proteolitičkim enzimima prije centrifugiranja i pohrane na -80 °C. Inhibitori proteaze su molekule koje blokiraju funkciju proteolitičkih enzima za razgradnju proteina. Dodavanje inhibitora proteaze isprva je preporučeno za prevenciju takvog neželjenog biološkog fenomena u studijama kemije proteina i proteomike (104, 105). Međutim, to više nije slučaj budući da se nisu uočile značajne promjena, niti kvantitativne niti kvalitativne, u urinskom proteomu u uzorcima pohranjenim na -30 °C i -70 °C bez inhibitora proteaze (106). Nadalje, inhibitori proteaza mogu utjecati na analizu proteina budući da mogu stvarati kovalentne veze s ciljnim proteinima ili se izravno natjecati s proteinima od interesa budući da se u uzorku mogu nalaziti u višoj koncentraciji (107). Iz ovih razloga, korištenje inhibitora proteaza nije bilo uvršteno u protokol ovog istraživanja.

Drugi predanalitički element koji može utjecati na detekciju proteina je vrijeme od uzorkovanja do pohrane, te od pohrane do analize. Prema protokolu ovog istraživanja, maksimalno vrijeme od uzorkovanja urina do centrifugiranja i pohrane alikvota na -80

°C bilo je 30 minuta. Iako bi se mogao provjeriti utjecaj skraćivanja vremena do zamrzavanja, primjerice na 15 minuta, takav postupak nije realno ostvariv u rutinskom laboratorijskom radu ako bi se neurotrofini i citokini uvrstili u rutinski određivane biljege OAB-a. Urinarni proteom je nakon centrifugiranja stabilan i u njemu ne dolazi do značajnih promjena ako se skladišti na sobnoj temperaturi do 6 h, na temperaturi 4 °C do 3 dana, a zamrznut na -20 °C i do nekoliko godina (108, 109). Radi toga se vrijeme od pohrane do analize ne može smatrati uzrokom propadanja proteina.

Na rezultat analize može utjecati temperatura pri kojoj se uzorci urina centrifugiraju. Prema protokolu ovog istraživanja, uzorci su se centrifugirali na sobnoj temperaturi. Dio prethodnih istraživanja također je naveo centrifugiranje pri sobnoj temperaturi, dok su druga u protokolima navela centrifugiranje pri temperaturi 4 °C. Budući da su istraživanja s obje verzije protokola navela i kvantificirane i nekvantificirane rezultate, to ukazuje na to da mogućnost kvantificiranja analita nema povezanosti s temperaturom centrifugiranja uzoraka (4, 44-47, 53, 76, 96, 97, 99, 100).

Rezultati ovog istraživanja govore u prilog korištenja IL-1RA, CCL2 i CCL13 kao dijagnostičkih biljega, te CXCL10 kao biljega praćenja uspješnosti terapije OAB-a. Ti rezultati podržavaju teoriju o mogućoj ulozi upale u patofiziologiji OAB-a kod djece, no nužno je daljnje daljnjeg istraživanja urinarnih proteina, posebice citokina i kemokina, kao potencijalnih neinvazivnih biljega. Ključno je utvrditi koju ulogu proupalni i protuupalni proteini imaju u patogenezi OAB-a u djece i odraslih, te analizirati postoje li razlike u putevima patogeneze među dobnim skupinama.

6. Zaključci

- Provedeno istraživanje podržava korištenje omjera koncentracija IL-1RA, CCL2 i CCL13 i kreatinina u urinu kao dijagnostičkih biljega OAB-a kod djece.
- Provedeno istraživanje podržava korištenje omjera koncentracija CXCL10 i kreatinina u urinu kao biljega praćenja uspješnosti terapije OAB-a kod djece.
- Rezultati ovog istraživanja ne podržavaju korištenje omjera koncentracija BDNF, NGF, IL-1 α , IL-6, CCL7, CCL8, CXCL1 i CXCL8 i kreatinina u urinu kao dijagnostičkih biljega niti biljega uspješnosti praćenja terapije kod djece s OAB-om.

7. Reference

1. Hall J, Hall M. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 14th ed. 2020. 325–328 p.
2. Nevéus T, von Gontard A, Hoebeke P, Hjälmås K, Bauer S, Bower W, et al. The Standardization of Terminology of Lower Urinary Tract Function in Children and Adolescents: Report from the Standardisation Committee of the International Children's Continence Society. *J Urol* 2006;176:314-24.
3. Xing D, Wang YH, Wen YB, Li Q, Feng JJ, Wu JW, et al. Prevalence and risk factors of overactive bladder in Chinese children: A population-based study. *Neurourol Urodyn* 2020;39:688–94.
4. Antunes-Lopes T, Pinto R, Barros SC, Botelho F, Silva CM, Cruz CD, et al. Urinary Neurotrophic Factors in Healthy Individuals and Patients with Overactive Bladder. *J Urol* 2013;189:359-65.
5. Digesu GA, Khullar V, Cardozo L, Salvatore S. Overactive bladder symptoms: do we need urodynamics? *Neurourol Urodyn* 2003;22:105-8.
6. McGuire E. Bladder instability and stress incontinence. *Neurourol Urodyn* 1988;7:563–7.
7. Austin PF, Bauer SB, Bower W, Chase J, Franco I, Hoebeke P, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function in children and adolescents: Update report from the standardization committee of the International Children's Continence Society. *Neurourol Urodyn* 2016;35:471–81.
8. Farhat W, Bagli DJ, Capolicchio G, O'Reilly S, Merguerian PA, Khoury A, et al. The Dysfunctional Voiding Scoring System: Quantitative Standardization of Dysfunctional Voiding Symptoms in Children. *J Urol* 2000;1011–5.
9. Bower WF, Wong EMC, Yeung CK. Development of a validated quality of life tool specific to children with bladder dysfunction. *Neurourol Urodyn* 2006;25:221-227.
10. Homma Y, Yoshida M, Seki N, Yokoyama O, Kakizaki H, Gotoh M, et al. Symptom assessment tool for overactive bladder syndrome—overactive bladder symptom score. *Urology* 2006;68:318–23.

11. Abdovic S, Colic M, Stemberger Maric L, Cuk M, Hizar I, Milosevic M. Overactivity index: A noninvasive and objective outcome measure in overactive bladder in children. *J Pediatr Urol* 2022;18:352.e1-352.e7.
12. Dos Santos J, Lopes RI, Koyle MA. Bladder and bowel dysfunction in children: An update on the diagnosis and treatment of a common, but underdiagnosed pediatric problem. *Can Urol Assoc J* 2017;11:S64–72.
13. Hertz D, Weiser A, Collette T, Reda E, Levitt S, Franco I. Dysfunctional Elimination Syndrome as an Etiology of Idiopathic Urethritis in Childhood. *J Urol* 2005;173:2132–7.
14. Drossman DA. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. *Gastroenterology* 2016;150:1262-1279.e2.
15. Lewis SJ, Heaton KW. Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:920–4.
16. Berger MY, Tabbers MM, Kurver MJ, Boluyt N, Benninga MA. Value of Abdominal Radiography, Colonic Transit Time, and Rectal Ultrasound Scanning in the Diagnosis of Idiopathic Constipation in Children: A Systematic Review. *J Pediatr* 2012;161:44-50.e2.
17. Coyne KS, Wein A, Nicholson S, Kvasz M, Chen CI, Milsom I. Comorbidities and personal burden of urgency urinary incontinence: a systematic review. *Int J Clin Pract* 2013;67:1015–33.
18. Milsom I, Coyne KS, Nicholson S, Kvasz M, Chen CI, Wein AJ. Global prevalence and economic burden of urgency urinary incontinence: a systematic review. *Eur Urol* 2014;65:79–95.
19. Salvatore S, Serati M, Origoni M, Candiani M. Is overactive bladder in children and adults the same condition? ICI-RS 2011. *Neurourol Urodyn* 2012;31:349–51.
20. Tekgul S, Stein R, Bogaert G, Undre S, Nijman RJM, Quaedackers J, et al. EAU-ESPU guidelines recommendations for daytime lower urinary tract conditions in children. *Eur J Pediatr* 2020;179:1069–77.
21. Franco I. Pediatric Overactive Bladder Syndrome. *Paediatr Drugs* 2007;9:379–90.
22. Shim J, Oh MM. Updates of Overactive Bladder in Pediatrics. *Int Neurourol J* 2023;27:3–14.

23. Shefchyk SJ. Sacral spinal interneurons and the control of urinary bladder and urethral striated sphincter muscle function. *J Physiol* 2001;533:57–63.
24. Yoshimura N, Chancellor MB. Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction. *Rev Urol* 2003;5 Suppl 8:S3–10.
25. Miller J, Hoffman E. The Causes and Consequences of Overactive Bladder. *J Womens Health (Larchmt)* 2006;15:251–60.
26. Fetscher C, Fleischman M, Schmidt M, Krege S, Michel MC. M3 muscarinic receptors mediate contraction of human urinary bladder. *Br J Pharmacol* 2002;136:641–4.
27. Ouslander JG. Management of overactive bladder. *N Engl J Med* 2004;350:786–99.
28. Rachaneni S, Arya P, Latthe P. Urinary nerve growth factor: A biomarker of detrusor overactivity? a systematic review. *Int Urogynecol J* 2013;24:1603–9.
29. Cruz CD. Neurotrophins in bladder function: what do we know and where do we go from here? *Neurourol Urodyn* 2014;33:39–45.
30. de Groat WC, Griffiths D, Yoshimura N. Neural control of the lower urinary tract. *Compr Physiol* 2015;5:327–96.
31. Liu HT, Kuo HC. Urinary nerve growth factor levels are elevated in patients with overactive bladder and do not significantly increase with bladder distention. *Neurourol Urodyn* 2009;28:78–81.
32. Chuang YC, Fraser MO, Yu Y, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. The role of bladder afferent pathways in bladder hyperactivity induced by the intravesical administration of nerve growth factor. *J Urol* 2001;165:975–9.
33. Steers WD, Tuttle JB. Mechanisms of Disease: the role of nerve growth factor in the pathophysiology of bladder disorders. *Nat Clin Pract Urol* 2006;3:101–10.
34. Yoshimura N, Bennett NE, Hayashi Y, Ogawa T, Nishizawa O, Chancellor MB, et al. Bladder overactivity and hyperexcitability of bladder afferent neurons after intrathecal delivery of nerve growth factor in rats. *J Neurosci* 2006;26:10847–55.
35. Schnegelsberg B, Sun TT, Cain G, Bhattacharya A, Nunn PA, Ford APDW, et al. Overexpression of NGF in mouse urothelium leads to neuronal hyperinnervation, pelvic sensitivity, and changes in urinary bladder function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298:534–47.

36. Pinto R, Frias B, Allen S, Dawbarn D, McMahon SB, Cruz F, Cruz CD. Sequestration of brain derived nerve factor by intravenous delivery of TrkB-Ig2 reduces bladder overactivity and noxious input in animals with chronic cystitis. *Neuroscience* 2010;166:907–16.
37. Lai PC, Chiu TH, Huang YT. Overexpression of BDNF and TrkB in human bladder cancer specimens. *Oncol Rep* 2010;24:1265-70.
38. Antunes-Lopes T, Carvalho-Barros S, Cruz CD, Cruz F, Martins-Silva C. Biomarkers in overactive bladder: a new objective and noninvasive tool? *Adv Urol* 2011;2011:382431.
39. Wang LW, Han XM, Chen CH, Ma Y, Hai B. Urinary brain-derived neurotrophic factor: a potential biomarker for objective diagnosis of overactive bladder. *Int Urol Nephrol* 2014;46:341-7.
40. Srinivasan P, Zervantonakis IK, Kothapalli CR. Synergistic effects of 3D ECM and chemogradients on neurite outgrowth and guidance: a simple modeling and microfluidic framework. *PLoS One* 2014;9:e99640.
41. Krewson CE, Klarman ML, Saltzman WM. Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain Res* 1995;680:196–206.
42. Fouad K, Pearse DD, Tetzlaff W, Vavrek R. Transplantation and repair: combined cell implantation and chondroitinase delivery prevents deterioration of bladder function in rats with complete spinal cord injury. *Spinal Cord* 2009;47:727–32.
43. Kashyap MP, Pore SK, de Groat WC, Chermansky CJ, Yoshimura N, Tyagi P. BDNF overexpression in the bladder induces neuronal changes to mediate bladder overactivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018;315:F45-F56.
44. Liu HT, Chancellor MB, Kuo HC. Decrease of urinary nerve growth factor levels after antimuscarinic therapy in patients with overactive bladder. *BJU Int* 2009;103:1668-72.
45. Liu HT, Chen CY, Kuo HC. Urinary nerve growth factor in women with overactive bladder syndrome. *BJU Int* 201;107:799-803.
46. Cho KJ, Kim HS, Koh JS, Kim JC. Changes in urinary nerve growth factor and prostaglandin E2 in women with overactive bladder after anticholinergics. *Int Urogynecol J* 2013;24:325-30.

47. Liu HT, Kuo HC. Urinary nerve growth factor levels are increased in patients with bladder outlet obstruction with overactive bladder symptoms and reduced after successful medical treatment. *Urology* 2008;72:104–8; discussion 108.
48. Oktar T, Kocak T, Oner-Iyidogan Y, Erdem S, Seyithanoglu M, Ziyilan O, et al. Urinary nerve growth factor in children with overactive bladder: a promising, noninvasive and objective biomarker. *J Pediatr Urol* 2013;9:617-21.
49. Özdemir K, Dinçel N, Berdeli A, Mir S. Can Urinary Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor be used in the Diagnosis and Follow-Up of Voiding Dysfunction in Children? *Urol J* 2016;13:2690-6.
50. Bagińska J, Sadowska E, Korzeniecka-Kozerska A. An Examination of the Relationship between Urinary Neurotrophin Concentrations and Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) Used in Pediatric Overactive Bladder Therapy. *J Clin Med* 2021;10:3156.
51. Huseynov A, Telli O, Hacıyev P, Okutucu TM, Akinci A, Ozkidik M, et al. Could urinary nerve growth factor and bladder wall thickness predict the treatment outcome of children with overactive bladder? *Int Braz J Urol* 2022;48:553-60.
52. Fukui S, Aoki K, Morizawa Y, Miyake M, Fujimoto K. Urinary Nerve Growth Factor Can Predict Therapeutic Efficacy in Children With Overactive Bladder. *Urology* 2017;103:214-7.
53. Liu HT, Lin H, Kuo HC. Increased serum nerve growth factor levels in patients with overactive bladder syndrome refractory to antimuscarinic therapy. *Neurourol Urodyn* 2011;30:1525-9.
54. Lin ZX, Chan NHT, Kwan YK, Chan YT, Zhang H, Tam KS, et al. A randomized controlled trial to assess the effectiveness and safety of acupuncture for overactive bladder: a study in Hong Kong population. *Chin Med* 2020;15:108.
55. Deng C, Zhang W, Peng Q, Hu X, Li M, Gao L, et al. Urinary nerve growth factor: a biomarker for detrusor overactivity in children? A meta-analysis and trial sequential analysis. *Pediatr Surg Int* 2019;35:1027-1032.
56. Sheerin, NS. Urinary tract infection. *Medicine (Abingdon)* 2011;39:384–9.
57. Apostolidis A, Jacques TS, Freeman A, Kalsi V, Popat R, Gonzales G, et al. Histological changes in the urothelium and suburothelium of human overactive bladder following intradetrusor injections of botulinum neurotoxin type A for the treatment of neurogenic or idiopathic detrusor overactivity. *Eur Urol* 2008;53:1245-53.

58. Monastero RN, Pentyala S. Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *Int J Inflam* 2017;2017:4309485.
59. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-50.
60. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M, Lopalco G, Maggio MC, et al. Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 2021;20:102763.
61. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998;16:27-55.
62. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6:a016295.
63. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1-78.
64. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:313-26.
65. Chang TT, Chen C, Chen JW. CCL7 as a novel inflammatory mediator in cardiovascular disease, diabetes mellitus, and kidney disease. *Cardiovasc Diabetol* 2022;21:185.
66. Proost P, Wuyts A, Van Damme J. Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J Leukoc Biol* 1996;59:67–74.
67. Mendez-Enriquez E, Garcia-Zepeda EA. The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation. *Inflammopharmacology* 2013;21:397–406.
68. Chakravorty SJ, Howie AJ, Girdlestone J, Gentle D, Savage CO. Potential role for monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4) in monocyte/macrophage recruitment in acute renal inflammation. *J Pathol* 2001;194:239-46.
69. Schumacher C, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. High- and low-affinity binding of GRO α and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10542-6.
70. Anisowicz A, Messineo M, Lee SW, Sager R. An NF-kappa B-like transcription factor mediates IL-1/TNF- α induction of gro in human fibroblasts. *J Immunol* 1991;147:520-7.

71. Burnier A, Shimizu Y, Dai Y, Nakashima M, Matsui Y, Ogawa O, et al. CXCL1 is elevated in the urine of bladder cancer patients. *Springerplus* 2015;4:610.
72. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:593-619.
73. Zhu Y, Yang S, Zhao N, Liu C, Zhang F, Guo Y, et al. CXCL8 chemokine in ulcerative colitis. *Biomed Pharmacother* 2021;138:111427.
74. Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 1987;166:1084-97.
75. Liu HT, Jiang YH, Kuo HC. Increased serum adipokines implicate chronic inflammation in the pathogenesis of overactive bladder syndrome refractory to antimuscarinic therapy. *PLoS One* 2013;8:e76706.
76. Farhan B, Chang H, Ahmed A, Zaldivair F, Ghoniem G. Characterisation of urinary monocyte chemoattractant protein 1: Potential biomarker for patients with overactive bladder. *Arab J Urol* 2019;17:58-60.
77. Ghoniem G, Faruqi N, Elmissiry M, Mahdy A, Abdelwahab H, Oommen M, et al. Differential profile analysis of urinary cytokines in patients with overactive bladder. *Int Urogynecol J* 2011;22:953-61.
78. Tyagi P, Tyagi V, Qu X, Chuang YC, Kuo HC, Chancellor M. Elevated CXC chemokines in urine noninvasively discriminate OAB from UTI. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016;311:F548-54.
79. Karlson CW, Rapoff MA. Attrition in randomized controlled trials for pediatric chronic conditions. *J Pediatr Psychol* 2009;34:782-93.
80. General Assembly of the World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Am Coll Dent* 2014;81:14-8.
81. Abrams P. Urgency: the key to defining the overactive bladder. *BJU Int* 2005;96 Suppl 1:1-3.
82. van Gool JD, de Jong TPVM, Winkler-Seinstra P, Tamminen-Möbius T, Lax H, Hirche H, et al. Multi-center randomized controlled trial of cognitive treatment, placebo, oxybutynin, bladder training, and pelvic floor training in children with functional urinary incontinence: European Bladder Dysfunction Study. *Neurourol Urodyn* 2014;33:482–7.

83. Wei C, Gao J, Kou L, Liu X, Lin T, He D. Can Urodynamic Findings of Overactive Bladder Determine the Treatment Effect of Urotherapy in Children? *J Coll Physicians Surg Pak* 2020;30:41–5.
84. Meijer EFJ, Nieuwhof-Leppink AJ, Dekker-Vasse E, de Joode-Smink GCJ, de Jong TPVM. Central inhibition of refractory overactive bladder complaints, results of an inpatient training program. *J Pediatr Urol* 2015;11:21.e1–5.
85. Fuyama M, Ikeda H, Oyake C, Onuki Y, Watanabe T, Isoyama K. Clinical features of, and association of bladder ultrasound and uroflowmetry with, overactive bladder recovery period in children. *Pediatr Int* 2018;60:569–75.
86. Jiang YH, Jhang JF, Hsu YH, Ho HC, Wu YH, Kuo HC. Urine biomarkers in ESSIC type 2 interstitial cystitis/bladder pain syndrome and overactive bladder with developing a novel diagnostic algorithm. *Sci Rep* 2021;11:914.
87. Tyagi P, Barclay D, Zamora R, Yoshimura N, Peters K, Vodovotz Y, et al. Urine cytokines suggest an inflammatory response in the overactive bladder: a pilot study. *Int Urol Nephrol* 2010;42:629–35.
88. Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP Jr. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;61:35-9.
89. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, et al. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000;96:34-40.
90. Arms L, Girard BM, Malley SE, Vizzard MA. Expression and function of CCL2/CCR2 in rat micturition reflexes and somatic sensitivity with urinary bladder inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;305:F111-22.
91. Russo RC, Quesniaux VFJ, Ryffel B. Homeostatic chemokines as putative therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Trends Immunol* 2023;44:1014-30.
92. Wu J, Hayes BW, Phoenix C, Macias GS, Miao Y, Choi HW, et al. A highly polarized TH2 bladder response to infection promotes epithelial repair at the expense of preventing new infections. *Nat Immunol* 2020;21:671-83.
93. Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 2011;32:470-7.

94. Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 1991;12:404-10.
95. Lande R, Giacomini E, Grassi T, Remoli ME, Iona E, Miettinen M, et al. IFN- α beta released by *Mycobacterium tuberculosis*-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol* 2003;170:1174-82.
96. Pennycuff JF, Schutte SC, Hudson CO, Karp DR, Malykhina AP, Northington GM. Urinary neurotrophic peptides in postmenopausal women with and without overactive bladder. *Neurourol Urodyn* 2017;36:740–4.
97. Yu WR, Jiang YH, Jhang JF, Kuo HC. Use of Urinary Biomarkers in Discriminating Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome from Male Lower Urinary Tract Dysfunctions. *Int J Mol Sci* 2023;24:12055.
98. Hsiao SM, Chang TC, Chen CH, Wu WY, Lin HH. Frequent nocturia episodes, a suboptimal response to treatment, and small bladder capacity predict the need for persistent antimuscarinic therapy or re-treatment after discontinuation of antimuscarinics in female overactive bladder. *Menopause* 2017;24:100–4.
99. Regauer S, Gamper M, Fehr MK, Viereck V. Sensory hyperinnervation distinguishes bladder pain syndrome/interstitial cystitis from overactive bladder syndrome. *J Urol* 2017;197:159–66.
100. Krebs J, Pavlicek D, Stoyanov J, Pannek J, Wöllner J. Nerve growth factor does not seem to be a biomarker for neurogenic lower urinary tract dysfunction after spinal cord injury: Nerve Growth Factor in NLUTD. *Neurourol Urodyn* 2017;36:659–62.
101. Gamper M, Viereck V. Re: Sheng W, Zhang H, Kirschner-Hermanns R. Could urinary nerve growth factor be a biomarker for overactive bladder? A meta-analysis. *Neurourol Urodyn* 2017;36:1703–10.
102. European Medicines Agency. Guideline on the clinical investigation of medicinal products for the treatment of urinary incontinence 2014.
103. Decramer S, Gonzalez de Peredo A, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands JL, et al. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:1850-62.
104. Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, Klein JB. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 2002;62:1461-9.

105. Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int* 2006;69:1471-6.
106. Havanapan PO, Thongboonkerd V. Are protease inhibitors required for gel-based proteomics of kidney and urine? *J Proteome Res* 2009;8:3109-17.
107. Thongboonkerd V. Practical points in urinary proteomics. *J Proteome Res* 2007;6:3881-90.
108. Schaub S, Wilkins J, Weiler T, Sangster K, Rush D, Nickerson P. Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney Int* 2004;65:323-32.
109. Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, et al. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol* 2006;7:230-40.

8. Popis kratica

BDNF	moždani neurotrofni čimbenik, engl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CCL2	CC kemokin ligand 2
CCL7	CC kemokin ligand 7
CCL8	CC kemokin ligand 8
CCL13	CC kemokin ligand 13
CCR2	C-C kemokin receptor tipa 2, engl. <i>C-C chemokine receptor 2</i>
CCR5	C-C kemokin receptor tipa 5, engl. <i>C-C chemokine receptor 5</i>
CRP	C-reaktivni protein
CXCL1	CXC kemokin ligand 1
CXCL8	CXC kemokin ligand 8
CXCL10	CXC kemokin ligand 10
CXCR3	kemokinski receptor CXC motiva 3, engl. <i>C-X-C motif chemokine receptor 3</i>
DVSS	upitnik o simptomima disfunkcijskog mokrenja, engl. <i>Dysfunctional voiding symptom score</i>
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	Europska agencija za lijekove, engl. <i>European Medicines Agency</i>
ESPU	Europsko društvo za pedijatrijsku urologiju, engl. <i>European Society for Paediatric Urology</i>

GRO- α	onkogen-alfa reguliran rastom, engl. <i>growth regulated oncogene-α</i>
ICCS	međunarodno društvo za dječju kontinenciju, engl. <i>International Children's Continence Society</i>
IFN- γ	interferon- γ
IL-1 α	interleukin 1 α
IL-1 β	interleukina 1 β
IL-1R	receptor interleukina-1, engl. <i>interleukin-1 receptor</i>
IL-1RA	antagonist na receptor interleukina 1, engl. <i>interleukin-1 receptor antagonist</i>
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IP-10	protein 10 inducibilan interferonom- γ , engl. <i>interferon-γ-inducible protein 10</i>
LOD	granice detekcije, engl. <i>limit of detection</i>
MCP-1	monocitni kemotaktični protein 1, engl. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MCP-2	monocitni kemotaktični protein 2, engl. <i>monocyte chemoattractant protein-2</i>
MCP-3	monocitni kemotaktični protein 3, engl. <i>monocyte chemoattractant protein-3</i>
MCP-4	monocitni kemotaktični protein 4, engl. <i>monocyte chemoattractant protein-4</i>
NF- κ B	nuklearni faktor κ B

OAB	prekomjerno aktivni mokraćni mjehur, engl. <i>overactive bladder</i>
OABSS	ocjena simptoma prekomjerno aktivnog mokraćnog mjehura, engl. <i>Overactive bladder symptom score</i>
OI	indeks hiperaktivnosti, engl. <i>Overactivity index</i>
PIN-Q	upitnik o kvaliteti života djece s inkontinencijom urina, engl. <i>Pediatric urinary incontinence quality of life score</i>
SEM	standardna pogreška, engl. <i>standard error mean</i>
SD	standardna devijacija
TNF- α	faktor nekroze tumora- α , engl. <i>tumor necrosis factor-α</i>

9. Životopis

Merima Čolić rođena je 1991. godine u Tuzli, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu i Klasičnu gimnaziju pohađala je u Zagrebu. Studij Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2010., a završila 2016. godine. Pripravnički staž je odradila u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti Zagreb od listopada 2016. do listopada 2017. Na Zavodu za pedijatriju Klinike za dječje bolesti od lipnja 2018. do lipnja 2022. radila je kao doktorandica - asistentica na uspostavnom istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanost "Uloga urinarnih biomarkera u prekomjerno aktivnom mokraćnom mjehuru u djece" čiji je voditelj bio dr.sc. Slaven Abdović, dr.med. Istovremeno je od studenog 2018. pohađala poslijediplomski doktorski studij medicinske biokemije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od listopada 2022. radi kao specijalizantica medicinske biokemije i laboratorijske medicine u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti Zagreb.

Članica je Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu.

Popis radova:

- Colic L, Woelfer M, **Colic M**, Leutritz AL, Liebe T, Fensky L, et al. Delayed increase of thrombocyte levels after a single sub-anesthetic dose of ketamine - A randomized trial. Eur Neuropsychopharmacol 2018;28:701–9.
- Abdovic S, **Colic M**, Stemberger Maric L, Cuk M, Hizar I, Milosevic M. Overactivity index: A noninvasive and objective outcome measure in overactive bladder in children. J Pediatr Urol 2022;18:352.e1-352.e7.
- **Colic M**, Rogic D, Lenicek Krleza J, Kozmar A, Stemberger Maric L, Abdovic S. Urinary brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor as noninvasive biomarkers of overactive bladder in children. Biochem Med (Zagreb) 2022;32:030706.
- **Čolić M**, Magdić B, Kolundžić M, Leniček Krleža J. Analytical verification of the Dymind D7-CRP automated analyser. Biochem Med (Zagreb) 2023;33:020703.



Overactivity index: A noninvasive and objective outcome measure in overactive bladder in children

^aDepartment of Pediatric Nephrology, Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia

^bPediatric Infectious Diseases Department, University Hospital for Infectious Diseases "dr. Fran Mihaljevic", Zagreb, Croatia

^cUniversity of Zagreb School of Medicine, Croatia

^dAndrija Stampar School of Public Health, Zagreb, Croatia

* Correspondence to: Slaven Abdovic, Klačeva 16, Zagreb, HR-10000, Croatia, Tel.: +385911144333
sabdovic@gmail.com
(S. Abdovic)

Keywords

Anticholinergics; Clinical markers; Children; Lower urinary tract symptoms; Overactive bladder; Urodynamics

Received 9 December 2021

Revised 8 March 2022

Accepted 10 March 2022

Available online 13 April 2022

Slaven Abdovic ^{a,*}, Merima Colic ^a, Lorna Stemberger Maric ^{b,c}, Martin Cuk ^a, Iva Hizar ^a, Milan Milosevic ^{c,d}

Summary

Introduction

Reports showed that observing detrusor overactivity (DO) and maximum cystometric capacity (MCC) may guide rational pharmacotherapy. Since urodynamic studies (UDS) are challenging for both patients and the healthcare system, a non-invasive objective prognostic marker is preferable.

Objectives

To investigate the value of the overactivity index (OI), a non-invasive measure calculated from the frequency-volume chart (FVC), for predicting the presence of symptoms and abnormal UDS in children with non-neurogenic OAB.

Study design

This was a prospective interventional study on a consecutive sample of 92 children with urgency treated with anticholinergics and standard urotherapy. Data from history, physical examination, bladder diaries, kidneys and bladder ultrasonography, uroflow, urinalysis, urine culture, and UDS was collected at baseline, and after 3 and 6 months. Binary logistic regression was used to evaluate noninvasive parameters as predictors of Overactive Bladder Symptom Score (OABSS) total score >2 and DO and/or small MCC defined as <65% of expected bladder capacity (EBC) for age. OI was calculated as $(1 - (\text{median (all voided volumes in FVC in ml)}) / (0.65 * \text{EBC in ml})) * 100$.

Results

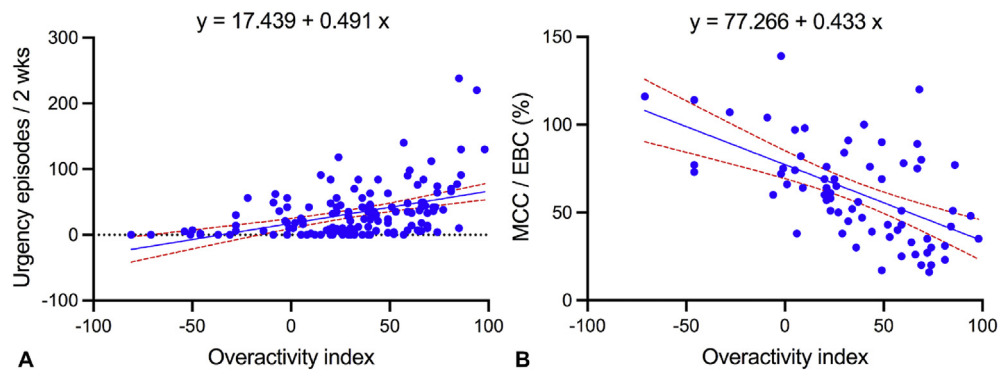
At baseline, 26 patients (36.1%) had DO and small MCC, while 21 patients (29.2%) only had DO. In 18 patients (25.0%) only small MCC was found. Seven patients had normal findings and 20 did not perform a urodynamic study. OI ≥ 23 returned as a single significant predictor of OABSS >2 (OR 7.97, 95% 1.97–32.22, $p = 0.004$) in multivariate regression ($R^2 = 30.8\%$; AUC = 0.86). OI correlated with "urgency episodes over two weeks" and MCC/EBC with medium ($r = 0.45$) and large effect ($r = -0.56$), respectively, $p = 0.001$.

Discussion

A strong correlation of OI and MCC/EBC ratio is useful, as rise in MCC is predictive of a positive outcome. Also, calculating the OI is more practical than performing UDS. This could contribute to the use of OI as a predictive marker for starting (or continuing) anticholinergic treatment (when OI ≥ 23) or for maintaining urotherapy alone (when OI < 23) in children with OAB. The limitations were lack of external validation of OI, a 37–49% drop-off rate for follow-up visits at 3 and 6 months, respectively, and not performing UDS on all participants at every follow-up visit.

Conclusions

OI was found to be a significant predictor of the presence of OAB symptoms and correlated with the number of urgency episodes. It could estimate how much MCC differs from EBC.



Summary Figure Linear regression analysis of overactivity index as a predictor of urgency episodes over two weeks (A) and maximum cystometric capacity/expected bladder capacity for age (MCC/EBC) ratio (B), with $R^2 = 20.1\%$, $p < 0.001$ and $R^2 = 31.6\%$, $p < 0.001$, respectively. Straight lines display the best-fit model to a series of data points with 95% confidence intervals represented as red dashed lines.

Introduction

Population-based studies reported that up to 10% of school-age children have functional lower urinary tract symptoms (LUTS) with rising prevalence [1], most probably due to increasing awareness and better access to specialized health care [2]. Overactive bladder (OAB) is frequently encountered in children and manifests with urgency, usually accompanied by frequency and nocturia, with or without urinary incontinence, in the absence of urinary tract infection (UTI) [3]. The need to focus on correcting OAB symptoms, especially incontinence, is repeatedly emphasized, because of the negative impact on emotional well-being, friendships, and learning opportunities [4]. Additionally, children with untreated OAB have a very good chance of becoming adults with OAB [5].

Observing detrusor overactivity (DO), the urodynamic hallmark of OAB, is challenging for both patients and the healthcare system. Although DO is limited with low sensitivity, reports in children have shown that the results of urodynamic studies (UDS) may predict when urotherapy will be unsuccessful and anticholinergic treatment is necessary [6,7]. Currently, UDS are not mandatory for the diagnosis or initial management of OAB and ESPU guidelines recommend considering urodynamic investigation in non-responders [8]. Therefore, a non-invasive objective prognostic measure for diagnosis and treatment is desirable, especially in children [9].

The hypothesis of our study was that overactivity index (OI), a measure of median voiding volume that we proposed, is a significant predictor of the presence of OAB symptoms and abnormal urodynamics. OI is presented for the first time in our report and it is developed as a non-invasive marker neutral to the patient's age and to the amount of daily drinking. The rationale was to provide a better representation of voided volumes recorded in frequency-volume chart (FVC), insensitive to the outliers, such as first morning or bedtime micturition. The objective was to investigate if OI is a valid measure in initiation and discontinuation of anticholinergics in non-neurogenic OAB in children. To achieve this, we analyzed its predicting

significance for treatment outcomes and compared it with standard diagnostic tests.

Materials and methods

Study design

This was a prospective interventional study that included 132 patients with urgency aged 4–17 years who were seen consecutively in the outpatient clinic between June 2018 and June 2021. Urgency was defined as a sudden and unexpected experience of an immediate and compelling need to urinate after achieving bladder control [3]. Urgency had to be noted more than once a week for at least 3 months. Exclusion criteria were acute UTI, central or peripheral nervous system disorders, lumbosacral region anomalies, surgical procedures or anomalies of the urinary or genital tract, diabetes mellitus, diabetes insipidus, polydipsia ($>2 \text{ L/m}^2/24 \text{ h}$), and anticholinergic treatment during the last 3 months.

Prior to baseline, patients underwent a screening evaluation which included history, physical examination, kidney and bladder ultrasound scan, urinalysis, and urine culture. A 7-day continence diary, two-day FVC, and uroflow with post-void residual (PVR) volume were recommended and presented at baseline UDS. Patients with a repeat PVR volume of $>50 \text{ mL}$ were excluded. Before baseline, participants with constipation were treated with osmotic laxatives, behavioral modifications, and dietary changes. Those with persisting LUTS after successful treatment of constipation were included in the study. All patients received standard urotherapy [3] which included information about OAB and behavioral modifications (timed urination, optimal voiding posture, adequate fluid intake, and avoidance of drinks that promote urination).

Procedures and intervention

For the continence diary, parents recorded all micturitions and incontinence episodes during one week period (Supplement 1). The chart provides information on the daily number of micturitions, episodes of urgency, urge and non-urge

incontinence, enuresis, and nocturia. The documented storage and voiding symptoms were interpreted according to ICCS terminology [3]. Data were upscaled for a two weeks period (by multiplying the reported number with 2) and Overactive Bladder Symptom Score (OABSS) [10] was automatically calculated from the collected data (total score of 0–15).

Parents completed a standardized FVC (Supplement 2) recording fluid intake and urine output during 48 h. We introduced the OI, calculated as the median of all recorded voiding volumes normalized to 65% of the expected bladder capacity (EBC) for age ($30 \times (\text{age in years} + 1)$ mL) [3], rounded to the integer value:

$$\text{Overactivity index} = (1 - (\text{median (all voided volumes in diary)}) / (0.65 * \text{EBC})) * 100$$

For uroflow, patients were instructed to void at normal desire. Voiding volumes >50 mL were considered reliable. The flow index was calculated for all uroflow recordings [11]. PVR volume was determined by ultrasonography. Bladder wall thickness was measured at full bladder sensation on the anterior bladder wall outside the thickened portion at the urachus. Diagnosis of constipation was made by Rome IV criteria, noting stool type 1 and 2 according to the Bristol Stool Chart, or measuring transverse rectal diameter >3 cm during the ultrasound exam [12].

Table 1 Patients' demographics and the summary of urodynamic studies at the baseline.

	Participants (N = 92)
Age, years	7.3 (4.6)
Females	71 (78.3%)
Duration of symptoms, years	1.1 (2.3)
Treated for constipation	9 (9.8%)
Duration from screening to Visit 1 (baseline), days	34 (69)
UDS performed	
Visit 1 (baseline)	72 (78.2%)
Visit 2 (3 months)	6 (10.3%)
Visit 3 (6 months)	9 (19.1%)
Additional visit	8 (27.6%)
UDS finding at baseline	
DO + small MCC	26 (36.1%)
DO only	21 (29.2%)
Small MCC only	18 (25.0%)
Normal cystometry	7 (9.7%)
Reasons for end of filling	
Pain and discomfort	63 (66.3%)
High Pdet (≥ 40 cmH ₂) ^a	28 (29.5%)
Leakage ^b	2 (2.1%)
MCC >135% of EBC	2 (2.1%)

N, number; UDS, urodynamic studies; DO, detrusor overactivity; MCC, maximum cystometric capacity; Pdet, detrusor pressure; EBC, expected bladder capacity.

Data were reported as median (interquartile range) for continuous variables and absolute number (%) for categorical variables.

^a In spite of temporary pump stop.

^b Exceeding the rate of infusion.

UDS were recommended to all patients with persistent urgency at baseline. UDS were performed without sedation or anesthesia and according to ICCS guidelines and good practice [13,14]. The patient was placed in the supine position, and the bladder was filled with saline at 25–30 °C via a pump at a filling rate of 10% of the maximum voided volume (MVV) from the FVC. The patient coughed only at the immediate start of the filling phase to verify correct recording of vesical and abdominal pressures. The end of filling was reached when the rate of leakage exceeded the rate of infusion, 135% of EBC was reached, the patient experienced pain or discomfort that did not subside after a temporary stop of filling, detrusor pressure exceeded 100 cmH₂O or was considered dangerously high by the investigator.

Oral oxybutynin (0.3–0.5 mg/kg/day bid) or solifenacin (5 mg orally QD for children aged ≥ 6 years) were recommended as initial therapy to all patients with DO, small bladder capacity (<65% of EBC), or persistent urgency and/or urge incontinence despite standard urotherapy. Standard urotherapy was continued in all patients during drug treatment. Follow-up visits were recommended at month 3 (visit 2), month 6 (visit 3), and thereafter if deemed necessary by the investigator ("additional" visit).

Outcomes

Variables derived from non-invasive measurements were analyzed using two outcomes. Outcome 1 was the presence of OAB symptoms defined by the OABSS cut-off value > 2. Outcome 2 was DO (overactive detrusor contractions ≥ 15 cmH₂O or basal detrusor pressure ≥ 20 cmH₂O) and/or small maximum cystometric capacity (MCC).

Ethical considerations

The protocol for the research project was approved by the Institutional Ethics Committee (Approval No. 02–26/10-8-1), and it conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from the participants and their legal guardians before study procedures. The study was registered at ClinicalTrials.gov under NCT02704013 (ID: pOAB-CHZ-01).

Statistical analysis

The dataset consisted of 226 observations collected from 92 participants: 92 at visit 1, 58 at visit 2, 47 at visit 3 and 29 at additional visit (Supplement 3). Repeated measures from the same subject were analyzed as separate observations. Missing data points were handled by pairwise deletion [15]. The Mann–Whitney U test compared continuous variables and the Fisher exact test analyzed differences in categorical variables between different outcomes. Variables with significant differences were used in univariate regression. Significant predictors with $R^2 > 5\%$ entered the multivariate regression. For multivariate binary logistic regression, new binary variables were set according to the calculated optimal cut-off values determined by the ROC analysis and the highest Youden's index [16]. Pearson's correlation coefficients were used to analyze the correlation between variables of interest.

Significant correlations with large ($r > 0.5$) and highest medium effects ($r > 0.4$) were analyzed with linear regression to produce a regression formula. P values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using jamovi (version 1.8.4; the jamovi Project, Sydney, Australia).

Results

Patient selection and demographics

Of 132 screened children with urgency, 92 were enrolled and reasons for the exclusions are reported in the patients' flow-chart (Supplement 3). Table 1 shows patients' demographics and UDS summary. UDS were performed in 72 patients at baseline (78.2%), 6 patients at 3 months (10.3%), 9 patients at 6 months (19.1%), and 8 patients (27.6%) at additional assessment. Ten (10.9%) patients did not start anticholinergics during the study. Of them, two patients failed to follow up after baseline, and eight received only standard urotherapy (parents were opposed to pharmacotherapy). Table 2 shows patients' initial success and OABSS scores for each visit.

Predictors and regression analysis

Table 3 shows the differences in parameters for outcomes 1 and 2. The OABSS score ≤ 2 was the optimal endpoint for complete absence of OAB symptoms as evaluated by the experts (SA and MC, pediatric nephrologists) on the basis of medical history, with sensitivity 87.50%, specificity 87.07%, PPV 59.57%, and NPV 96.97% (Youden's 0.746, AUC 0.940). Table 4 shows the regression analysis for predicting OAB symptoms (outcome 1). Supplement 4 shows the selected cut-off values of the predictors. $OI \geq 23$ returned as a single significant predictor of $OABSS > 2$ in the multivariate regression. The positive likelihood ratio was 2.21 (95% CI 1.35–3.61) with odds of 88% (~1 in 1.1 with $OI \geq 23$ have OAB symptoms). The negative likelihood ratio was 0.37 (95% CI 0.24–0.56) with odds of 55% (~1 in 2.2 with $OI < 23$ do not have OAB

symptoms). For outcome 2, the number of daytime incontinence episodes was not a significant predictor in the regression analysis ($p = 0.167$). None of the parameters tested were significant predictors for DO only (data not shown).

Subanalysis of overactivity index

Supplement 5 shows the correlation between the OI and the continuous variables used to calculate the OABSS and the UDS variables. The correlations were significant ($p < 0.001$) between OI and "urgency episodes over two weeks" and the MCC/EBC ratio with medium ($r = 0.45$) and large effect ($r = -0.56$), respectively. The linear regression models for these correlations explained 20.1% and 30.6% of the variance, respectively.

Discussion

Our study showed that OI, a measure calculated from FVC, significantly predicts the presence of OAB symptoms, correlates with the number of urgency episodes, and could be used to predict the deviation of MCC from EBC. Because of the high incidence, increasing prevalence, and significant negative impact on a child's life, there is continued interest in investigating non-invasive parameters in OAB. The role of UDS, which serves to define the pathophysiology of LUTS and guide treatment, is still debated. Can we truly treat patients in the best manner possible without the additional information from UDS, or is it difficult to distinguish patients with idiopathic OAB from those with other causes of LUTS if we use only non-invasive methods? To observe DO, the urodynamic hallmark of OAB, an invasive and expensive test is required, and trained and educated personnel are needed. Moreover, DO as a diagnostic and prognostic parameter for OAB has low sensitivity, present in 41.8% of pediatric patients [6] and 44% and 58% of adults with dry and wet OAB, respectively [17,18]. We observed DO in 65% of participants at baseline, similarly to adults [19]. Also, recent data from adult studies suggest that the presence or absence of DO is not entirely predictive of a successful response to therapy, pharmacologic or otherwise [20]. Only one-third of pediatric DO cases demonstrate urgency, and the correlation between OAB symptoms and DO is poor [21]. Accordingly, our study showed no significant difference in the presence of OAB symptoms between patients with and without DO, 82.7% vs 87.1%, $p = 0.76$. In general, it is considered that invasive UDS should be performed in children only when the outcome affects the choice of treatment [14].

Nevertheless, there are few studies in pediatrics, raising the question of whether UDS can help select appropriate therapeutic options? Digesu et al. reported that UDS are useful in adults to confirm different causes of LUTS and provide guidance for accurate management, leading to the selection of patients who will benefit from anticholinergics [17]. Wei et al. studied 232 children with non-neurogenic OAB and reported a significantly lower success rate of standard urotherapy in patients with DO and small MCC (defined as $< 60\%$ of EBC). They achieved significant treatment responses in 69% of children with normal UDS, 60% with DO, 33% with small MCC, and only 14% with DO and small MCC combined [6]. Correspondingly, another pediatric study [7] reported that lower bladder volumes observed in UDS may

Table 2 Patients' initial success and OABSS scores.

	Visit 1 (baseline) N = 92	Visit 2 (3 months) N = 58	Visit 3 (6 months) N = 47
Initial success ^a	NA		
Non-response		9 (15.6%)	3 (6.3%)
Partial		35 (60.3%)	24 (51.1%)
Complete		14 (24.1%)	20 (42.6%)
OABSS, total score	7.0 (4.0)	3.5 (3.0)*	2.0 (4.5)*

N, number; NA, not applicable; OABSS, overactive bladder symptom score.

Data were reported as median (interquartile range) for continuous variables and absolute number (%) for categorical variables.

* $p < 0.001$.

^a Initial success was assessed according to ICCS [3]: non-response with $< 50\%$ reduction, partial response with 50–99% reduction, complete response with 100% reduction of symptoms.

Table 3 List of investigated parameters (per diagnostic test) and their differences for selected outcomes in children with non-neurogenic overactive bladder (baseline and follow-up visits).

Parameters	Outcome 1		P	Outcome 2		P
	OABSS >2	OABSS ≤2		DO or small MCC	Normal UDS	
	N = 132	N = 47		N = 84	N = 11	
Continence diary						
Maximum time between voids, hours	3.0 (1.0)	3.0 (1.0)	<0.001	3.0 (1.0)	3.0 (0.8)	0.37
Urgency, N over 2 wks ^a	34 (44)	0 (0)	<0.001	34 (49)	21 (37)	0.22
Daytime incontinence, N over 2 wks ^a	5 (20)	0 (0)	<0.001	4 (16)	0 (1)	0.022
Nocturia, N over 2 wks ^a	0 (4)	0 (0)	0.007	0 (5)	0 (0)	0.17
Enuresis, N over 2 wks	0 (6)	0 (0)	0.026	0 (8)	0 (4)	0.63
Frequency voiding chart						
Average number of voidings per day ^a	9 (4)	6 (3)	<0.001	9 (5)	11 (6)	0.70
Maximum voided volume, mL	180 (130)	260 (105)	<0.001	200 (170)	225 (115)	0.59
Mean voided volume, mL	83 (63)	147 (80)	<0.001	86 (88)	107 (66)	0.18
Night diuresis, mL	190 (150)	245 (205)	0.025	200 (140)	295 (45)	0.11
Fluid intake per day, mL	1175 (650)	1250 (450)	0.15	1200 (580)	1250 (675)	0.89
Fluid intake per kg per day, mL	44 (27)	49 (22)	0.27	45 (25)	32 (21)	0.12
Overactivity index	41 (43)	17 (29)	<0.001	38 (47)	32 (39)	0.56
Uroflow						
Qmax, mL/s	17 (9)	17 (10)	0.8	15 (9)	16 (12)	0.79
Time to Qmax, s	5 (5)	5 (6)	0.4	5 (7)	11 (10)	0.27
Voided volume, mL	156 (120)	192 (140)	0.19	155 (123)	195 (72)	0.18
Flow time, s	15 (12)	15 (17)	0.54	18 (16)	30 (19)	0.12
Voiding time, s	16 (17)	17 (22)	0.68	22 (21)	35 (38)	0.21
Average Q, mL/s	9 (6)	9 (5)	0.78	8 (5)	9 (6)	0.65
PVR volume, mL	0 (5)	0 (2)	0.69	0 (8)	0 (5)	0.83
Flow index	0.81 (0.50)	0.78 (0.40)	0.92	0.75 (0.44)	0.80 (0.38)	0.69
Bladder ultrasound						
Bladder thickness, mm	3 (1)	2 (1)	0.068	3 (1)	2 (1)	0.06
Transverse rectal diameter, mm	20 (8)	20 (3)	0.23	20 (5)	20 (5)	0.81
Symptom score						
OABSS, total score ^b	7 (3)	1 (2)	<0.001	6 (4)	6 (4)	0.097
Urodynamics^c						
Number of overactive detrusor contractions	2 (6)	5 (14)	0.34	3 (7)	0 (0)	<0.001
Filling volume of the 1st contraction, mL	70 (70)	80 (39)	0.69	76 (65)	NA	NA
End basal detrusor pressure, cmH2O	13 (14)	15 (9)	0.42	14 (12)	10 (7.5)	0.017
Maximal detrusor pressure, cmH2O	23 (36)	37 (59)	0.21	31 (41)	10 (8)	<0.001
Compliance, mL/cmH2O	12 (16)	7 (19)	0.88	7 (13)	20 (12)	0.002
MCC, mL	144 (104)	214 (44)	0.008	147 (94)	232 (171)	0.001
MCC/EBC, %	51 (38)	87 (32)	0.001	56 (38)	84 (19)	<0.001

N, number; wks, weeks; Qmax, peak flow rate; Q, flow rate; PVR, post void residual; OABSS, overactive bladder symptom score; MCC, maximum cystometric capacity; EBC, expected bladder capacity for age; NA, not applicable.

Data were reported as median (interquartile range).

P values were calculated using Mann–Whitney U test. Significant values are shown in bold.

^a Used for calculation of OABSS and therefore not used in the regression model for outcome 1.

^b Omitted in the regression model for outcome 1.

^c Omitted from regression models for both outcomes.

indicate a more severe clinical substrate and predict poorer responses to treatment. We achieved complete initial success at 6 months in 75%, 30%, 33%, and 38% of patients with normal UDS, DO, small MCC, and DO and small MCC combined at baseline, respectively. This suggests that knowing whether a patient has DO or small MCC may contribute to rational pharmacotherapy and guide the duration of therapy.

We hypothesized that a non-invasive parameter such as OI could facilitate clinical decisions about initiation, continuation, or discontinuation of anticholinergic treatment. We have shown that the correlation of OI and MCC, normalized to EBC,

is of large effect and that calculating the OI is more practical than performing UDS. The concept of OI is based on expert experience that although children with OAB may have age-appropriate EBC (determined by FVC), most of the voidings recorded are below the volume defined as small bladder. It seemed necessary to develop a new measure to accurately balance the recorded micturitions in the FVC, and provide a better representation of voided volumes. Because the MVV is an outlier and the number of voidings per day is affected by daily drinking, we proposed a new measure. The OI is the median of voided volumes normalized to 65% of the EBC for the

Table 4 Univariate and multivariate binary logistic regression analysis for predicting OABSS >2 (outcome 1).

Predictors	Univariate regression			Multivariate regression ^a		
	OR (95% CI)	R ²	P	Cut off	OR (95% CI)	P
Maximum time between voids (CD)	0.42 (0.26–0.68)	9.16%	<0.001	≤2.5 h	0.39 (0.04–4.16)	0.44
Enuresis episodes over two weeks (CD)	1.08 (1.10–1.17)	2.64%	0.042			
Maximum voided volume (FVC)	0.99 (0.99–0.99)	9.14%	<0.001	≤175 mL	1.85 (0.32–10.77)	0.5
Mean voided volume (FVC)	0.98 (0.97–0.99)	16.79%	<0.001	≤87 mL	0.12 (0.01–1.58)	0.11
Maximum night diuresis (FVC)	0.99 (0.99–1.00)	2.41%	0.047			
Overactivity index (FVC)	1.02 (1.01–1.03)	9.34%	<0.001	≥23	7.97 (1.97–32.22)	0.004

CD, continence diary; FVC, frequency-volume chart.

Significant *P* values are shown in bold.^a Model: hierarchical (highest to lowest R² value from univariate analysis); R² = 30.8%; AUC = 0.858.

patient's age. Positive values indicate that 50% of reported voiding volumes are below the value defined by ICCS as a small bladder for age. The lower the OI value, the higher the volumes of all voidings relative to EBC.

A strong correlation of OI and MCC/EBC ratio is useful overall because MCC is the primary endpoint in most studies. MCC is the most reproducible of the accepted OAB treatment endpoints and is recommended by the European Medicines Agency as the primary endpoint for pediatric OAB trials [22]. An increase in MCC is predictive of a positive outcome compared with more variable efficacy measures, such as frequency and incontinence episodes [23]. In our sample, there was a significant difference between patients with (65.7%, N = 46) and without OAB symptoms (30.8%, N = 4) regarding decreased MCC, *p* = 0.03. Furthermore, a sub-analysis of OI showed that patients with DO and small MCC combined had a significantly higher OI (median 53, IQR 37, N = 24) compared to all others (median 29, IQR 55, N = 45), *p* = 0.02. With respect to other non-invasive parameters, MVV and mean voided volume correlated significantly with MCC with large effect, as previously reported [24,25], but were not significant predictors of the presence of OAB symptoms. In this matter, OI proved to be the only predictor in multivariate regression. In 101 of 137 patients, it successfully discriminated between patients with and without OAB symptoms and correlated with the number of urgency episodes from the tedious 7-day voiding diary. This could contribute to the use of OI as an objective marker for starting or continuing anticholinergic treatment (when OI ≥ 23) or for maintaining urotherapy alone (when OI < 23) in children with OAB. The disadvantage of the chosen cut-off is low specificity; 35% of patients with OI < 23 will have OAB symptoms and could be identified as false negatives if the diagnosis is based on OI alone. As a screening tool, a high OI could alert clinicians to the possibility of OAB, especially in cases where parents do not observe urgency as a predominant symptom, such as in primary enuresis or in the initial workup of daytime incontinence. A high OI could be useful to appropriately guide urotherapy and drug treatment. The advantage is that OI is independent of the number of daily micturitions affected by fluid intake and is insensitive to outliers, such as large first-morning or small pre-bedtime voidings, which often lead to interpretation problems of FVC.

This study has several limitations. First, it lacks external validation of OI on different cohorts. However, because of the routine use of FVC in LUTS and the ease of calculating the OI, other centers and experts could perform reproducible studies and provide more data on the usefulness of the OI. Another obstacle is the accurate recording of the number of voids and volumes, since the OI is derived from the FVC, which is fundamentally prone to human error and measuring bias. Second, there is a significant drop-off during the study. Only half of the enrollees completed visit 3, probably because of fear of repeating invasive or tedious diagnostic procedures, lack of motivation for follow-up, or significant clinical improvement. This dropout rate may substantially contribute to the attrition bias. Third, UDS were not performed at all visits for all participants because it was difficult for children to undergo frequent UDS. At follow-up visits, parents were more likely to perform UDS if there was no favorable treatment response. This resulted in fewer participants who completed all assessments according to the study protocol and could lead to verification bias.

The advantage of the study was that all children with urgency were screened, which limited selection bias and made the results more generalizable. We adhered to strict end-of-filling criteria, which maximized the objectivity of the reported MCC. To objectively calculate the OABSS, we used data from a 7-day voiding diary instead of parent or patient recall. Finally, we provided a web tool for others to validate the OI on their pediatric cohorts (<https://bit.ly/OIndex>). For further validation, it will be of interest to analyze the value of the OI in predicting symptom recurrence in children with OAB after discontinuation of anticholinergics.

Conclusions

OI was found to be a significant predictor of OAB symptoms and correlated with the number of urgency episodes. It could also be used to estimate how much MCC might differ from EBC in children with non-neurogenic OAB. OI may contribute to a noninvasive and objective assessment of the lower urinary tract function. Its use could increase the likelihood of avoiding ill-defined treatment strategies, such as the continuation of non-beneficial treatment or premature discontinuation of treatment leading to symptom relapse.

Data availability

Study data is available at the online repository (<https://osf.io/xqm4t/>).

Conflict of interest

None.

Acknowledgment

Funding: This work was supported by the Croatian Science Foundation [grant UIP-2017-05-5379]. The funding source had no role in the design, practice or analysis of this study.

References

- [1] Söderstrom U, Hoelcke M, Alenius L, Söderling A-C, Hjern A. Urinary and faecal incontinence: a population-based study. *Acta Paediatr* 2007;93:386–9.
- [2] Vaz GT, Vasconcelos MM, Oliveira EA, Ferreira AL, Magalhães PG, Silva FM, et al. Prevalence of lower urinary tract symptoms in school-age children. *Pediatr Nephrol* 2012;27:597–603.
- [3] Austin PF, Bauer SB, Bower W, Chase J, Franco I, Hoebeke P, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function in children and adolescents: update report from the standardization committee of the International Children's Continence Society. *Neurourol Urodyn* 2016;35:471–81.
- [4] Wolfe-Christensen C, Veenstra AL, Kovacevic L, Elder JS, Lakshmanan Y. Psychosocial difficulties in children referred to pediatric urology: a closer look. *Urology* 2012;80:907–12.
- [5] Fitzgerald MP, Thom DH, Wassel-Fyr C, Subak L, Brubaker L, Van Den Eeden SK, et al. Childhood urinary symptoms predict adult overactive bladder symptoms. *J Urol* 2006;175:989–93.
- [6] Wei C, Gao J, Kou L, Liu X, Lin T, He D. Can urodynamic findings of overactive bladder determine the treatment effect of urotherapy in children? *J Coll Physicians Surg Pak* 2020;30:41–5.
- [7] Meijer EFJ, Nieuwhof-Leppink AJ, Dekker-Vasse E, de Joode-Smink GCJ, de Jong TPVM. Central inhibition of refractory overactive bladder complaints, results of an inpatient training program. *J Pediatr Urol* 2015;11:21. e1–5.
- [8] Radmayr C, Bogaert B, Dogan HS, Kočvara R, Nijman JM, Stein R, Tekgül S. EAU Guidelines on Pediatric Urology n.d. <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Paediatric-Urology-2018-large-text.pdf> (accessed December 21, 2020).
- [9] Fuyama M, Ikeda H, Oyake C, Onuki Y, Watanabe T, Isoyama K. Clinical features of, and association of bladder ultrasound and uroflowmetry with, overactive bladder recovery period in children. *Pediatr Int* 2018;60:569–75.
- [10] Homma Y, Yoshida M, Seki N, Yokoyama O, Kakizaki H, Gotoh M, et al. Symptom assessment tool for overactive bladder syndrome—overactive bladder symptom score. *Urology* 2006;68:318–23.
- [11] Franco I, Shei-Dei Yang S, Chang S-J, Nussenblatt B, Franco JA. A quantitative approach to the interpretation of uroflowmetry in children. *Neurourol Urodyn* 2016;35:836–46.
- [12] Joensson IM, Siggaard C, Rittig S, Hagstroem S, Djurhuus JC. Transabdominal ultrasound of rectum as a diagnostic tool in childhood constipation. *J Urol* 2008;179:1997–2002.
- [13] Bauer SB, Nijman RJM, Drzewiecki BA, Sillen U, Hoebeke P. International Children's Continence Society Standardization Subcommittee. International Children's Continence Society standardization report on urodynamic studies of the lower urinary tract in children. *Neurourol Urodyn* 2015;34:640–7.
- [14] de Jong TPVM, Klijn AJ. Urodynamic studies in pediatric urology. *Nat Rev Urol* 2009;6:585–94.
- [15] Kang H. The prevention and handling of the missing data. *Korean J Anesthesiol* 2013;64:402–6.
- [16] Ruopp MD, Perkins NJ, Whitcomb BW, Schisterman EF. Youden Index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection. *Biom J* 2008;50:419–30.
- [17] Digesu GA, Khullar V, Cardozo L, Salvatore S. Overactive bladder symptoms: do we need urodynamics? *Neurourol Urodyn* 2003;22:105–8.
- [18] Hashim H, Abrams P. Is the bladder a reliable witness for predicting detrusor overactivity? *J Urol* 2006;175:191–4. discussion 194–5.
- [19] Chen S-L, Ng S-C, Huang Y-H, Chen G-D. Are patients with bladder oversensitivity different from those with urodynamically proven detrusor overactivity in female overactive bladder syndrome? *J Chin Med Assoc* 2017;80:644–50.
- [20] Rovner ES, Goudelocke CM. Urodynamics in the evaluation of overactive bladder. *Curr Urol Rep* 2010;11:343–7.
- [21] Oktar T, Kocak T, Oner-Iyidogan Y, Erdem S, Seyithanoglu M, Ziyilan O, et al. Urinary nerve growth factor in children with overactive bladder: a promising, noninvasive and objective biomarker. *J Pediatr Urol* 2013;9:617–21.
- [22] European Medicines Agency. Guideline on the clinical investigation of medicinal products for the treatment of urinary incontinence. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-medicinal-products-treatment-urinary-incontinence_en.pdf; 2014.
- [23] Newgreen D, Bosman B, Hollestein-Havelaar A, Dahler E, Besuyen R, Sawyer W, et al. Solifenacin in children and adolescents with overactive bladder: results of a phase 3 randomised clinical trial. *Eur Urol* 2017;71:483–90.
- [24] Uluocak N, Oktar T, Ander H, Ziyilan O, Acar O, Rodoplu H, et al. Which method is the most reliable in determination of bladder capacity in children with idiopathic overactive bladder? A comparison of maximum voided volume, uroflowmetry and maximum cystometric capacity. *J Pediatr Urol* 2009;5:480–4.
- [25] Chiang C-Y, Fan Y-H, Lin AT-L, Chen K-K. First morning voided volume as a valuable tool for evaluating patients with overactive bladder. *Urological Science* 2014;25:79–82.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2022.03.012>.

Urinary brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor as noninvasive biomarkers of overactive bladder in children

Merima Colic^{*1}, Dunja Rogic², Jasna Lenicek Krleza³, Ana Kozmar², Lorna Stemberger Maric⁴, Slaven Abdovic¹

¹Department of Pediatric Nephrology, Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia

²Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia

³Department of Laboratory Diagnostics, Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia

⁴Pediatric Infectious Diseases Department, University Hospital for Infectious Diseases "dr. Fran Mihaljevic", Zagreb, Croatia

*Corresponding author: colic.merima@gmail.com

Abstract

Introduction: Overactive bladder (OAB) is the most common urinary disorder and the leading cause of functional daytime intermittent urinary incontinence in children. The aim of this study was to determine whether urinary brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) concentrations, normalized to urine creatinine, could be used as biomarkers for diagnosis and treatment monitoring of OAB in children.

Materials and methods: Urine samples of 48 pediatric patients with OAB were collected at the start of anticholinergic therapy (baseline), at follow-up visits (3 and 6 months), and from 48 healthy controls. Urinary BDNF and NGF concentrations were determined by ELISA method (Merck, Darmstadt, Germany) and Luminex method (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Differences of frequency between quantifiable analyte concentrations between subject groups were determined using Fisher's exact test.

Results: There was no statistically significant difference between quantifiable analyte concentrations between patients at baseline and the control group for BDNF and NGF by either the ELISA or Luminex method ($P = 1.000$, $P = 0.170$, $P = 1.000$, and $P = N/A$, respectively). There was a statistically significant difference between quantifiable BDNF by the ELISA method between patients at baseline and complete success follow-up ($P = 0.027$), while BDNF by Luminex method and NGF by both methods were not statistically significant ($P = 0.078$, $P = 0.519$, and $P = N/A$, respectively).

Conclusions: This study did not demonstrate that urinary BDNF and NGF concentrations, can be used as biomarkers for diagnosis and therapy monitoring of OAB in children.

Keywords: biomarker; brain-derived neurotrophic factor; child; nerve growth factor; overactive bladder

Submitted: March 29, 2022

Accepted: July 11, 2022

Introduction

Overactive bladder (OAB) is the most common urinary tract disorder and the leading cause of functional daytime intermittent urinary incontinence, with a prevalence of 9% in children aged 5-14 years (1). The obligatory symptom is urgency, which may be accompanied by frequent urination during the day, daytime intermittent urinary incontinence, enuresis, and nocturia in the absence of a urinary tract infection (2). In most cases, the diagnosis of OAB is based solely on clinical symp-

toms, mainly because of the invasiveness of urodynamic studies which may cause pain, discomfort, and lack of cooperation from the child. In addition, detrusor overactivity (DO) is a pathognomonic finding during urodynamics, but it is present in only 50-70% of affected individuals (3,4). Considering the high prevalence, the negative impact on the quality of life of the child and their family, the economic burden, and the fact that OAB in childhood is a strong predisposing factor

for OAB in adulthood, it is important to improve the objective and noninvasive diagnosis and treatment monitoring of OAB in children (5-7).

The pathogenesis of OAB is not fully understood, but studies from the last decade have indicated the role of neurotrophins in the mechanisms of manifestation of this lower urinary tract dysfunction (8). Neurotrophins belong to a large family of trophic factors that are critical for the survival of neurons and the formation, maintenance, and regulation of synapses. The most studied representatives of neurotrophins in lower urinary tract disorders are nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). In several clinical studies of adult patients with OAB, a statistically significant higher concentration of NGF was found in the urine of patients compared with healthy controls (9). Urinary NGF concentration correlated proportionally with symptom severity (10,11). After successful anticholinergic treatment, urinary NGF concentrations were significantly lower in both adults and children (3,10,12-15). Nevertheless, high concentrations of urinary NGF persisted in patients with poor response to therapy, probably because of the presence of chronic inflammation of the bladder wall (16). In these studies, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect neurotrophins.

Despite multiple studies showing that patients with OAB have significantly higher urinary concentrations of NGF and BDNF, several recent studies have yielded conflicting results. On the one hand, some studies found no significant difference in the NGF/creatinine ratio between patients with OAB and the control group (17,18). On the other hand, other studies showed unmeasurable NGF concentrations using various commercially available ELISA kits (19-21). These studies have drawn attention to the importance of using multiple methods to establish optimal procedures for biomarker detection in urine. A 2019 meta-analysis on the use of urinary NGF as a biomarker for DO in children notes that it is a potential noninvasive marker but highlights the need for further clinical studies to confirm this hypothesis (22).

The aim of this study was to determine whether BDNF and NGF concentrations, normalized to urine creatinine, could be used as diagnostic and treatment-monitoring biomarkers for OAB in the pediatric population.

The first hypothesis was that urinary BDNF and NGF concentrations normalized to urine creatinine would be higher in children with OAB before anticholinergic therapy than in the control group. The second hypothesis was that urinary BDNF and NGF concentrations normalized to urinary creatinine would be higher in children with OAB before anticholinergic treatment than after successful treatment.

Materials and methods

Subjects

This was a prospective intervention study that included 48 outpatients with urgency aged 4-17 years who were consecutively examined between February 2020 and November 2021. The urgency was defined as a sudden and unexpected experience of an immediate and compelling need to urinate after achieving bladder control and had to be noted more than once *per week* for at least 3 months. Exclusion criteria were acute urinary tract infection (UTI), central or peripheral nervous system disorders, lumbosacral anomalies, surgical procedures, or urinary or genital tract anomalies, diabetes mellitus, diabetes insipidus, polydipsia ($> 2 \text{ L/m}^2/24 \text{ h}$), and anticholinergic treatment in the previous 3 months.

The control group consisted of 48 inpatients recruited from different pediatric departments between June 2019 and November 2020. They had normal micturition behavior and clinical examination with no symptoms or confirmed lower urinary tract disease, no history of urinary tract infection, chronic disease, or urinary tract or genital abnormalities.

The protocol for the research project was approved by the Institutional Ethics Committee (Approval No. 02-26/10-8-1), and it conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki. Informed

consent was obtained from the participants and their legal guardians before the study procedures. The study was registered at ClinicalTrials.gov under NCT02704013 (ID: pOAB-CHZ-01).

Methods

The screening examination for OAB patients included a history, physical examination, 2-day frequency-volume chart (FVC), ultrasound examination of the kidneys and bladder, uroflow examination with determination of residual urine volume after urination (*post-void residual*, PVR), urinalysis, and urine culture. Prior to the start of the study, participants with constipation were treated with osmotic laxatives, behavioral modifications, and dietary changes. All patients received standard urotherapy which includes the following components:

1. Information about the normal function of the lower urinary tract (LUT) and how the child in question deviates from the norm,
2. Behavior modification instructions such as regular voiding habits, correct voiding posture, avoidance of holding maneuvers, regular bladder and bowel emptying patterns,
3. Lifestyle advice such as balanced fluid intake and diet, reduced caffeine intake,
4. Recording of symptoms and voiding habits in bladder diaries or frequency-volume charts, and
5. Support and encouragement through regular follow-up with the caregiver (23).

Urodynamics was recommended to all patients who had persistent urinary urgency at baseline. Urodynamics was performed according to International Children's Continence Society (ICCS) guidelines and good practice (23). All enrolled patients received oral oxybutynin (0.3-0.5 mg/kg/day bid) or solifenacin (5 mg oral once daily for children aged ≥ 6 years) as initial therapy. Standard urotherapy was continued in all patients during drug treatment. Follow-up examinations were recommended at month 3 and month 6, during which the treatment outcomes were assessed using the ICCS classification (23). Patients in whom symp-

toms remitted 100% were defined as a complete success, patients in whom symptoms remitted 50-99% were defined as a partial success, and patients in whom symptoms remitted less than 50% were defined as nonresponders.

The urine samples of the subjects and the control subjects were taken at the subjective sensation of a full bladder and the urge to void. The samples were midstream clean catch samples collected in sterile urine collection cups with screw caps at room temperature. One millilitre of the sample was used for the analysis of creatinine concentration in urine on the Olympus AU680 automated biochemistry analyser (Beckman Coulter, Brea, USA) by the enzymatic method within one hour of collection. Ten millilitres of urine was centrifuged at 3000xg for 10 minutes at room temperature within 30 minutes of collection. Five 1.5 mL aliquots of the supernatant were frozen and stored at - 80 °C until analysis of neurotrophin concentrations. The aliquots were thawed only once; there were no cases of multiple freeze-thaw cycles.

The concentrations of BDNF and NGF were analysed by the ELISA method (Merck, Darmstadt, Germany) and Luminex method (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) according to the manufacturers' instructions.

Enzyme-linked immunosorbent assay is an *in vitro* enzyme-linked immunoassay for the quantitative measurement of a target protein in biological samples. In this study, the ELISA 96 well plate is coated with specific capture antibodies (against BDNF or NGF). Standard solutions and samples are pipetted into the wells and the target protein present in a sample is bound to the wells by the immobilized antibody. The wells are washed and a biotinylated detection antibody specific for the target protein is added. After washing out the unbound biotinylated antibody, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin is pipetted into the wells. The wells are washed again, a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution is added to the wells, and the color develops in proportion to the amount of bound target protein. The stop solution changes color from blue to yellow, and the absorbance in each well is measured by a microplate reader at 450 nm. The con-

centration of the target protein in the samples is calculated from the standard curve generated from the known concentrations and the absorbance obtained from the standard solutions used. The detection range of the ELISA kits used for this study was 0.07-16.00 ng/mL for BDNF, while the detection range for NGF was 6.86-5000.00 pg/mL. Quality control was not performed during the analyte investigation. The analyses were performed within two years of sample collection. Protein stability was not investigated prior to analysis. BDNF and NGF concentrations were analysed by the ELISA methods concurrently from the same aliquot.

The Luminex method is a multiplex sandwich bead-based immunoassay that combines the ELISA method with flow cytometry. It uses magnetic beads that are internally dyed with a graded mixture of fluorescent dyes. Varying the level of internal staining of the beads produces hundreds of different fluorescence profiles that can be individually interrogated and classified in a single sample. Microspheres of a single identity are conjugated on their surface to a specific capture antibody for a protein of interest. A mixture of beads is pipetted into a 96-well plate. After incubation of the sample and beads, the wells are washed and a cocktail of biotinylated detection antibodies specific for the target proteins is added. After washing out the unbound biotinylated antibodies, phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin is pipetted into the wells. After another round of washing, the microsphere-cytokine reporter compound is analysed as a single sphere suspension through a flow chamber equipped with excitation lasers and an electronic detection device that measures the intensity of fluorescence of the microsphere-cytokine reporter compound, similar to a flow cytometer. Proteins are distinguished by the color of the internally stained beads themselves, and their relative abundance is quantified by measuring the fluorescence intensity of the detection antibody conjugated to the reporter dye. The detection range of the Luminex kit used for this study was 1.33-5450 pg/mL for BDNF, while the detection range for NGF was 7.35-30,100 pg/mL. Quality control was not performed during the analyte investigation. The analyses were performed within two

years of sample collection. Protein stability was not investigated prior to analysis. BDNF and NGF concentrations were analysed with the same Luminex assay.

Statistical analysis

Because analyte concentrations were unquantifiable in the majority of samples, the neurotrophin concentration results were converted to categorical variables. Concentrations of BDNF were determined by the ELISA method and were converted into categories of < 0.07 ng/mL and ≥ 0.07 ng/mL. Also, BDNF concentrations determined by the Luminex method were converted into categories of < 1.33 pg/mL and ≥ 1.33 pg/mL. Concentrations of NGF were determined by the ELISA method and were converted into categories of < 6.86 pg/mL and ≥ 6.86 pg/mL. Also, NGF concentrations determined by the Luminex method were converted into categories of < 7.35 pg/mL and ≥ 7.35 pg/mL. Descriptive statistics were used to describe the demographic and disease data of the study participants. The age of the subjects was expressed as median and range (min-max). Frequencies of sex in the patient and control group, quantifiable neurotrophin concentration results, and complete success rate were expressed as percentages for sample sizes > 100 , ratios for sample sizes > 30 and < 100 , and as the number of the observations divided with the total number of subjects within the group. The differences between the concentrations of BDNF and NGF measured by both methods were compared between the baseline group of patients and the control group was determined to test the first hypothesis. The differences between the concentrations of BDNF and NGF measured by both methods between the baseline group of patients and the follow-up group of patients with complete success was determined to test the second hypothesis. Differences of frequency between categorical variables (*i.e.*, analyte concentrations) between subject groups were determined using Fisher's exact test. Statistical analysis was performed with the statistical program MedCalc, version 18.9 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

The median age of the patient group was 7 (3-17) years. The median age of the control group was 13 (6-17) years. The patient group consisted of 43 (0.90) girls and 5 (0.10) boys. The control group consisted of 19 (0.40) girls and 29 (0.60) boys.

Of the 48 patients recruited, 35 patients completed their follow-up at month 3 and 33 patients completed their follow-up at month 6. At follow-up visits, 18 (0.38) patients had complete initial success either 3 or 6 months since the start of anticholinergic therapy. This is in accordance with previously published data on the success of anticholinergic treatment of children with OAB (24).

Of the 164 samples analysed, a majority of samples had unquantifiable analyte concentrations regardless of a subject group (patients with OAB or controls) or method used (ELISA or Luminex). These concentrations are considered to be less than the lowest analysed concentration standard. Overall, the concentration of BDNF in urine was < 0.07 ng/mL in 150 (91%) of the samples analysed by the ELISA method, while the Luminex method

showed a BDNF concentration of < 1.33 pg/mL in 121 (74%) samples. Urinary NGF concentration was < 6.86 pg/mL in 158 (96%) samples analysed by the ELISA method, while all 164 (100%) samples had a concentration of < 7.35 pg/mL by the Luminex method.

Table 1 shows the overview of the number of quantifiable BDNF and NGF concentrations across subject groups using the ELISA and Luminex methods.

Table 2 shows the results of Fisher's exact test between subject groups, analytes, and methods.

The only statistically significant difference in frequency of quantifiable concentrations of BDNF using the ELISA method was found between the patient group baseline and patients with complete success at follow-up ($P = 0.027$).

An additional analysis of individual patient assessments showed that of the 18 patients with complete success at follow-up, four patients had quantifiable BDNF concentration with at follow-up but not baseline.

TABLE 1. Overview of the number of quantifiable BDNF and NGF concentrations across healthy controls and patient groups using the ELISA and Luminex methods

Analyte and method	Category	Patients baseline (N = 48)	Patients follow-up - nonresponders and partial success (N = 47)	Patients follow-up - complete success (N = 21)	Control group (N = 48)
BDNF	≥ 0.07 ng/mL, N	1 (0.02)	8 (0.17)	4/21	1 (0.02)
ELISA	< 0.07 ng/mL, N	47 (0.98)	39 (0.83)	17/21	47 (0.98)
BDNF	≥ 1.33 pg/mL, N	5 (0.10)	21 (0.45)	6/21	11 (0.23)
Luminex	< 1.33 pg/mL, N	43 (0.90)	26 (0.55)	15/21	37 (0.77)
NGF	≥ 6.86 pg/mL, N	1 (0.02)	4 (0.09)	1/21	0 (0.00)
ELISA	< 6.86 pg/mL, N	47 (0.98)	43 (0.91)	20/21	48 (1.00)
NGF	≥ 7.35 pg/mL, N	0	0	0/21	0
Luminex	< 7.35 pg/mL, N	48 (1.00)	47 (1.00)	21/21	48 (1.00)

N – number. BDNF – brain-derived neurotrophic factor. NGF – nerve growth factor. ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay.

TABLE 2. Results of Fisher's exact test

Analyte	Method	Patients baseline vs. control group	Patients baseline vs. patients follow-up - complete success
BDNF	ELISA	P = 1.000	P = 0.027
	Luminex	P = 0.170	P = 0.078
NGF	ELISA	P = 1.000	P = 0.519
	Luminex	NA	NA

P values were calculated using Fisher's exact test. BDNF – brain-derived neurotrophic factor. NGF – nerve growth factor. ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay. NA – not applicable.

Discussion

In contrast to most previously published studies, this study did not find a statistically significant difference between urinary BDNF and NGF concentrations in OAB patients before treatment and control subjects. Consequently, it does not support their use as noninvasive diagnostic biomarkers for OAB.

There was no statistically significant difference between patients' NGF concentrations before therapy and at complete success follow-up, so this study does not support its use as a biomarker to monitor therapy in children with OAB.

Because a statistically significant difference in the frequency of BDNF concentrations quantifiable by the ELISA method was found between the group of patients at baseline and those with complete success at follow-up ($P = 0.027$), additional analysis of individual patient assessments was performed. In contrast to the expected results of a decrease in BDNF concentration after successful anticholinergic therapy, no patient with complete success showed a decrease in concentration at follow-up. As indicated in the results, four patients had quantifiable BDNF concentration at follow-up but not at baseline. Therefore, this study could not confirm the usefulness of urinary BDNF as a biomarker for monitoring therapy in children with OAB because it was not possible to determine the decline in concentrations in successfully treated patients.

These results are not consistent with those of most previously published studies. There are several factors that should be considered when interpret-

ing this difference. One of the most important is the limited sensitivity of current ELISA technology for determining urinary BDNF and NGF concentrations. In their letter to the editor on a meta-analysis on the usefulness of NGF as a biomarker in urine OBA, Gamper and Viereck emphasise that many studies used ELISA kits from Promega (Promega, Madison, USA) that were later shown to quantify urine components other than NGF and were therefore withdrawn from the market (25). They also refer to two of the above-mentioned studies in which NGF concentrations were below the limit of detection, which is consistent with our study (20,21).

Given that the Luminex technology has similar detection limits for NGF concentrations, it is not surprising that it gives similar results. On the other hand, the detection limit for BDNF concentrations is lower, so it was possible to quantify it in more samples. However, in our study, only 43 (26%) of the samples had quantifiable BDNF concentrations using this method, so we conclude it is not yet sensitive enough to use BDNF as a biomarker for OAB in children.

Another factor to consider is the preanalytical process from sample collection to neurotrophin analysis. One of the possible reasons for low concentrations could be that proteins are digested by proteases before centrifugation and freezing at -80° . Previously published studies showing quantifiable concentrations of neurotrophins did not report the use of protease inhibitors, so we did not

include their use in our study protocol. Another preanalytical element that may affect the detection of proteins is the time from sample collection to storage and analysis. In our study protocol, the maximum time from sample collection to centrifugation and storage at -80°C was 30 min. Although shortening the time could be further tested, we believe that a shorter time, such as 15 minutes, is not feasible for routine laboratory testing, should these proteins be used regularly as biomarkers for OAB. An additional element in the study protocols that could be considered is the temperature during centrifugation. We centrifuged samples at room temperature, as did some of the cited studies, whereas other investigators centrifuged them at 4°C (3,10-13,16,17,20,21). Since both protocols yielded both measurable and unquantifiable concentrations of neurotrophins, we do not believe that the temperature of centrifugation affected the results of the analysis of urinary BDNF and NGF concentrations (3,10-13,16,17,20,21).

A limitation of this study was that neurotrophin concentrations were analysed at different time intervals after sample collection. To our knowledge, there are no studies on the stability of neurotrophins in urine samples stored at -80°C . It was unfeasible to standardise the interval from collection to analysis because this was a prospective intervention study in the paediatric population and the target proteins were analysed with immunoassays performed on batches of 80 samples. A second limitation was that the patient and control groups were not matched for age and sex. The reason for this limitation was that this study was performed as part of a larger study funded by the Croatian Science Foundation, in which one of the objectives was to determine the age and sex variations of neurotrophins in healthy children. Therefore, it was not possible to have a disproportionate number of girls in the control group as in the patient group.

Taking into consideration the time and resources that have been devoted to researching the role of neurotrophins in the pathology of OAB, the question is what to do next. One possibility is to develop immunochemical assays with a lower limit of

detection that are more suitable for urine analyses. Another option is to use more sensitive methods such as tandem mass spectrometry. However, since the ultimate goal in determining new urinary biomarkers for diagnosis and treatment monitoring is that they be widely available and inexpensive, methods that are difficult to use and expensive are not of interest. Alternatively, the research community may turn its attention to novel target proteins such as inflammatory cytokines and chemokines in urine. Their study could help us determine the pathophysiology of OAB and the role that inflammation plays in it. One of the potential biomarkers studied in recent years is monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a chemokine that regulates monocyte/macrophage migration and infiltration. Some studies showed increased MCP-1 concentrations in the urine of adult patients with OAB compared to the control group (26,27). To our knowledge, there has been no study of inflammatory cytokines and chemokines in the urine of children with OAB.

Our study does not support the hypothesis that urinary BDNF and NGF concentrations, normalized to urine creatinine, are higher in children with OAB before anticholinergic therapy than in the control group. In addition, the hypothesis that urinary BDNF and NGF concentrations normalized to urine creatinine are higher in children with OAB before anticholinergic treatment than after successful treatment could not be confirmed.

Acknowledgments

This study was funded by Croatian Science Foundation (grant UIP-2017-05-5379). The funding source had no role in the design, practice, or analysis of this study.

Potential conflict of interest

None declared.

Data availability statement

The data generated and analysed in the presented study are available from the corresponding author on request.

References

1. Xing D, Wang YH, Wen YB, Li Q, Feng JJ, Wu JW, et al. Prevalence and risk factors of overactive bladder in Chinese children: A population-based study. *Neurourol Urodyn.* 2020;39:688–94. <https://doi.org/10.1002/nau.24251>
2. Nevéus T, von Gontard A, Hoebeke P, Hjälmås K, Bauer S, Bower W, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function in children and adolescents: report from the Standardisation Committee of the International Children's Continence Society. *J Urol.* 2006;176:314–24. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(06\)00305-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(06)00305-3)
3. Antunes-Lopes T, Pinto R, Barros SC, Botelho F, Silva CM, Cruz CD, et al. Urinary neurotrophic factors in healthy individuals and patients with overactive bladder. *J Urol.* 2013;189:359–65. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.187>
4. Digesu GA, Khullar V, Cardozo L, Salvatore S. Overactive bladder symptoms: do we need urodynamics? *Neurourol Urodyn.* 2003;22:105–8. <https://doi.org/10.1002/nau.10099>
5. Coyne KS, Wein A, Nicholson S, Kvasz M, Chen C-I, Milsom I. Comorbidities and personal burden of urgency urinary incontinence: a systematic review. *Int J Clin Pract.* 2013;67:1015–33. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12164>
6. Milsom I, Coyne KS, Nicholson S, Kvasz M, Chen C-I, Wein AJ. Global prevalence and economic burden of urgency urinary incontinence: a systematic review. *Eur Urol.* 2014;65:79–95. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.08.031>
7. Salvatore S, Serati M, Origoni M, Candiani M. Is overactive bladder in children and adults the same condition? ICI-RS 2011: Overactive Bladder in Children and Adults. *Neurourol Urodyn.* 2012;31:349–51. <https://doi.org/10.1002/nau.22223>
8. Rachaneni S, Arya P, Latthe P. Urinary nerve growth factor: a biomarker of detrusor overactivity? A systematic review. *Int Urogynecol J.* 2013;24:1603–9. <https://doi.org/10.1007/s00192-013-2104-0>
9. Cruz CD. Neurotrophins in bladder function: what do we know and where do we go from here? *Neurotrophins in the Bladder. Neurourol Urodyn.* 2014;33:39–45. <https://doi.org/10.1002/nau.22438>
10. Liu H-T, Chancellor MB, Kuo H-C. Decrease of urinary nerve growth factor levels after antimuscarinic therapy in patients with overactive bladder. *BJU Int.* 2009;103:1668–72. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08380.x>
11. Liu H-T, Chen C-Y, Kuo H-C. Urinary nerve growth factor in women with overactive bladder syndrome. *BJU Int.* 2011;107:799–803. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09585.x>
12. Cho KJ, Kim HS, Koh JS, Kim JC. Changes in urinary nerve growth factor and prostaglandin E2 in women with overactive bladder after anticholinergics. *Int Urogynecol J.* 2013;24:325–30. <https://doi.org/10.1007/s00192-012-1854-4>
13. Liu H-T, Kuo H-C. Urinary nerve growth factor levels are increased in patients with bladder outlet obstruction with overactive bladder symptoms and reduced after successful medical treatment. *Urology.* 2008;72:104–8. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2008.01.069>
14. Oktar T, Kocak T, Oner-Iyidogan Y, Erdem S, Seyithanoglu M, Ziyilan O, et al. Urinary nerve growth factor in children with overactive bladder: a promising, noninvasive and objective biomarker. *J Pediatr Urol.* 2013;9:617–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2012.06.003>
15. Özdemir K, Dinçel N, Berdeli A, Mir S. Can urinary nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor be used in the diagnosis and follow-up of voiding dysfunction in children? *Urol J.* 2016;13:2690–6.
16. Liu H-T, Lin H, Kuo H-C. Increased serum nerve growth factor levels in patients with overactive bladder syndrome refractory to antimuscarinic therapy: Serum NGF in OAB. *Neurourol Urodyn.* 2011;30:1525–9. <https://doi.org/10.1002/nau.21118>
17. Pennycuff JF, Schutte SC, Hudson CO, Karp DR, Malykhina AP, Northington GM. Urinary neurotrophic peptides in postmenopausal women with and without overactive bladder. *Neurourol Urodyn.* 2017;36:740–4. <https://doi.org/10.1002/nau.23011>
18. Hsiao S-M, Chang T-C, Chen C-H, Wu W-Y, Lin H-H. Frequent nocturia episodes, a suboptimal response to treatment, and small bladder capacity predict the need for persistent antimuscarinic therapy or re-treatment after discontinuation of antimuscarinics in female overactive bladder. *Menopause.* 2017;24:100–4. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000730>
19. Lin Z-X, Chan NHT, Kwan Y-K, Chan YT, Zhang H, Tam K-YS, et al. A randomized controlled trial to assess the effectiveness and safety of acupuncture for overactive bladder: a study in Hong Kong population. *Chin Med.* 2020;15:108. <https://doi.org/10.1186/s13020-020-00388-w>
20. Krebs J, Pavlicek D, Stoyanov J, Pannek J, Wöllner J. Nerve growth factor does not seem to be a biomarker for neurogenic lower urinary tract dysfunction after spinal cord injury: Nerve Growth Factor in NLUTD. *Neurourol Urodyn.* 2017;36:659–62. <https://doi.org/10.1002/nau.22987>
21. Regauer S, Gamper M, Fehr MK, Viereck V. Sensory hyperinnervation distinguishes bladder pain syndrome/interstitial cystitis from overactive bladder syndrome. *J Urol.* 2017;197:159–66. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.06.089>
22. Deng C, Zhang W, Peng Q, Hu X, Li M, Gao L, et al. Urinary nerve growth factor: a biomarker for detrusor overactivity in children? A meta-analysis and trial sequential analysis. *Pediatr Surg Int.* 2019;35:1027–32. <https://doi.org/10.1007/s00383-019-04448-7>
23. Austin PF, Bauer SB, Bower W, Chase J, Franco I, Hoebeke P, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function in children and adolescents: Update report from the standardization committee of the International Children's Continence Society. *Neurourol Urodyn.* 2016;35:471–81. <https://doi.org/10.1002/nau.22751>
24. van Gool JD, de Jong TPVM, Winkler-Seinstra P, Tamminen-Möbius T, Lax H, Hirche H, et al. Multi-center randomized controlled trial of cognitive treatment, placebo, oxybutynin, bladder training, and pelvic floor training in children with functional urinary incontinence: European Blad-

- der Dysfunction Study. *Neurourol Urodyn*. 2014;33:482–7. <https://doi.org/10.1002/nau.22446>
25. Gamper M, Viereck V. Re: Sheng W, Zhang H, Kirschner-Hermanns R. Could urinary nerve growth factor be a biomarker for overactive bladder? A meta-analysis. *Neurourol Urodyn*. 2017;9999:1–8. doi: 10.1002/nau.23210. *Neurourol Urodyn*. 2017;36:2190–1. <https://doi.org/10.1002/nau.23268>
26. Ghoniem G, Farhan B, Csuka D, Zaldivar F. Potential role of monocyte chemoattractant protein-1 in monitoring disease progression and response to treatment in overactive bladder patients. *Int Neurourol J*. 2020;24:341–8. <https://doi.org/10.5213/inj.2040366.183>
27. Jiang YH, Jhang JF, Hsu YH, Ho HC, Wu YH, Kuo HC. Urine biomarkers in ESSIC type 2 interstitial cystitis/bladder pain syndrome and overactive bladder with developing a novel diagnostic algorithm. *Sci Rep*. 2021;11:914. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80131-5>