УДК 616.61:612.273.2:616.12-008.331.1-02:617.55]:001.891.5(045)

РОЛЬ ГИПОКСИИ В МЕХАНИЗМАХ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ ИНТРААБДОМИНАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Морозова О.Л. [1], Цыплаков А.А. [3], Морозов Д.А.[1,2], Захарова Н.Б. [3]

[1] *ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия, morozova_ol@list.ru*
[2] *ФГБУ «Научный центр здоровья детей», Москва, Россия*
[3] *ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия*

Проведено изучение механизмов повреждения почек в модели интраабдоминальной гипертензии (ИАГ) у новорожденных крыс. В исследование включено 100 новорожденных крысят, которые были разделены на три группы: группа А (n=40) - крысята с легкой степенью ИАГ (ИАД= 6-13 мм рт. ст.); группа В (n=40) – крысята с тяжелой степенью ИАГ (интраабдоминальное давление (ИАД)=14-20 мм рт. ст.); группа С (n=20) – контрольная группа с однократно наркотизированными здоровыми крысятами. Моделирование ИАГ осуществляли путем введения в брюшную полость объемообразующего препарата коллагена. ИАД измеряли методом интравезикальной манометрии. В двух точках (на 3-и и 8-е сутки экспозиции ИАГ различной степени тяжести) исследованы показатели газового состава и кислотно-основного состояния (КОС), уровень васкуло-эндотелиального фактора роста (VEGF), креатинина в крови, а также скорость почасового диуреза и морфологические изменения в почках. Установлено, что степень повреждения почек коррелирует с уровнем ИАГ и тяжестью гипоксии. Данное исследование подтверждает необходимость своевременной диагностики и лечения ИАГ в неонатальной практике.

Ключевые слова: гипоксия, васкуло-эндотелиальный фактор роста, повреждение почек, интраабдоминальная гипертензия.

THE ROLE HYPOXIA IN MECHANISMS OF KIDNEY INJURY IN INTRAABDOMINAL HYPERTENSION IN EXPERIMENT

Morozova O.L.[1], Tsyplacov A.A.[3], Morozov D.A.[1,2] , Zacharova N.B.[3]

[1] *Sechenov First Moscow State Medical Univesity, Moscow, Russia, morozova_ol@list.ru*
[2] *Scientific Centre of Children Health, Moscow, Russia*
[3] *Saratov State Medical University n. a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia*

Mechanisms of kidney damage in experimentally induced intraabdominal hypertension (IAH) in newborn rats have been studied. 100 newborn rats have been included into the research divided into three groups: group A (n=40) – rats with mild IAH (IAP = 6-13 mm hg); group B (n=40) – rats with severe IAH (IAP = 14-20 mm hg); group C (n=20) – control group consisting of once narcotized healthy rats. IAH modelling has been implemented by the injection of collagen bulking agent into the abdominal cavity under the control of intraabdominal pressure (IAP) being measured in an indirect way using intravesical manometry. In two points (on the 3rd and 8th days of different stages IAH exposion) there have been measured: blood gases and acid-base status, vasculoendothelial growth factor (VEGF) and creatin blood levels and also an hourly diuresis rate and morphologic changes of kidneys. It has been established that the degree of kidney injury correlates with the IAH level and the severity of hypoxia. Current study proves the necessity of timely diagnostics and treatment of IAH in neonatal practice.

Keywords: hypoxia, vasculo-endothelial growth factor, renal damage, intraabdominal hypertension.

В последнее десятилетие отмечен рост интереса исследователей к проблемам интраабдоминальной гипертензии (ИАГ) у больных различного профиля [1]. Особую категорию пациентов составляют новорожденные, у которых развитие ИАГ накладывается на критический период постнатальной адаптации ребенка, зачастую сопровождающийся сердечно-сосудистой, дыхательной, почечной, печеночной и другими дисфункциями [2].

Наиболее чувствительными органами к интраабдоминальной гипертензии являются почки, в которых даже при сохраненной системной гемодинамике отмечается снижение перфузионного и, соответственно, эффективного фильтрационного давления [4]. Ряд авторов отмечает, что даже после декомпрессии брюшной полости функция почек, как правило, восстанавливается не сразу, а лишь через определённый промежуток времени [5; 6].

В связи с этим требуется дальнейшее детальное изучение механизмов повреждения почки в зависимости от степени и длительности повышения интраабдоминального давления, разработка методов ранней диагностики, мониторирования, лечения и профилактики нефропатий при ИАГ у новорожденных.

Цель

Определить роль гипоксии в механизмах повреждения почек при ИАГ в эксперименте на основе оценки показателей газового состава и кислотно-основного состояния крови, уровня васкуло-эндотелиального фактора роста (VEGF), функциональных и морфологических изменений почек.

Материалы и методы

Исследование выполнено в Центре коллективного пользования ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, одобрено локальным этическим комитетом. Все манипуляции с животными проводились с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными (в соответствии с правилами лабораторной практики, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.; документами OECD по гармонизированным принципам Надлежащей лабораторной практики («Principles of Good Laboratory Practice»).

Таблица 1

Характеристика групп экспериментальных животных

Группа	**ИАД, мм рт.ст.**	**Возраст, сут.**	**Вес, г**
A	6-13	1-8	6,9±0,6
B	14-20	1-8	7,3±0,7
C	1-3	1-8	6,6±0,5

В эксперименте использовались 10 самок крыс с пометами в количестве 8-11 штук у каждой особи. Все новорожденные крысята были разделены на три группы: группа A (n=40) – крысята с легкой степенью ИАГ; группа B (n=40) – крысята с тяжелой степенью ИАГ; группа C (n=20) – контрольная группа с однократно наркотизированными здоровыми крысятами (табл. 1).

Наркотизированным фторотаном животным выполняли катетеризацию мочевого пузыря и интравезикальную манометрию по способу I. Kron и соавт. (1989) (рис. 1). Моделирование повышенного ИАГ у малых лабораторных животных осуществлялось путем введения в брюшную полость объемообразующего препарата коллагена по способу Федорова Д.А., 2013 [3].

Рис. 1. Моделирование ИАГ у новорожденных крыс и измерение ИАД

Забор крови осуществляли у наркотизированного животного из полости сердца (левого желудочка). Полученные образцы сыворотки крови хранили при t – 25 ºС.

Всем группам животных в 2–х точках исследования (1-я точка - 3-и сутки экспозиции индуцированной ИАГ; 2-я точка - 8-е сутки экспозиции индуцированной ИАГ) проводился комплекс обследования: анализ газового (pO_2, pCO_2), кислотно-основного (pH^+, $stHCO_3^-$, BE, анионный пробел) состава крови, содержание креатинина, васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) в сыворотке крови, общий анализ мочи. Содержание VEGF-фактора определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем Bender Medsystems (Австрия) на анализаторе Stat Fax 2010 (Stat Fax, США).

Морфологическое и морфометрическое исследование осуществлялось с помощью тринокулярного микроскопа Micros MC 100 TXP с встроенной цифровой фотокамерой (Австрия). Для анализа использовались гистологические препараты ткани почек, с толщиной среза 5-7 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином.

Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica 9.0 (StatSoft-Russia, 2009). Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (LQ-UQ). Анализ связи двух признаков проводился с применением критерия Спирмена. Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В группе А у крысят с легкой степенью ИАГ парциальное давление кислорода и углекислого газа в артериальной крови не отличалось от показателей контрольной группы С ни в 1-й, ни во 2-й точках исследования (табл. 2). По всей видимости, при увеличении объема брюшной полости и ограничении подвижности диафрагмы возникала компенсаторная одышка с увеличением вентиляции верхушек легких, что позволяло поддерживать нормальный газовый состав крови. Показатели pH крови в этой группе не имели значимых изменений по сравнению с контрольной группой С, однако дефицит оснований в 1-й точке больше, чем во 2-й точке, и больше, чем в группе контроля.

Таблица 2

Данные комплекса обследования в группе А

Исследуемый показатель	**Группа С**	**Группа А**		p	p^*
		1-я точка	***2-я точка***		
	Me LQ-UQ	**Me LQ-UQ**	**Me LQ-UQ**		
pO_2, мм рт.ст.	84 81-86	85,5 78,5-89	82,5 75-87,5	0,351	0,287
pCO_2, мм рт.ст.	43,5 42-46,5	46 42-47,5	41 38,5-44	0,330	0,01
pH	7,34 7,32–7,35	7,33 7,3–7,34	7,322 7,303-7,338	0,156	0,636
BE, ммоль/л	-1,5 -2–(-1)	-3,15 -4–(-2,5)	-2,1 -3–(-1)	0, 001	0,005
HCO_3^-, ммоль/л	18,5 17-21	15 10,5-18,5	13 10-16,5	0,001	0,098
Креатинин, мкмоль/л	76 67–83	84 74–98	89 75–102	0,031	0,438
VEGF, пг/мл	30 29–31	39 38-40	64 42 -65	0,441	0,0001
ИАД, мм рт.ст.	2 1-2,5	9 7-10,5	9,5 7,5-11	0,001	0,627
Диурез, мкл/ч	17 13-20	14 12-17,5	12 10,5-14,5	0,111	0,0793

Примечание:

р – критерий достоверности различий Манна-Уитни показателей 1-й группы по отношению к показателям группы сравнения;

р* – критерий достоверности различий Вилкоксона по отношению к показателям 1-й точки.

Одновременно отмечалось статистически значимое повышение уровня креатинина в сыворотке крови и в 1-й, и во 2-й точках исследования при сопоставлении с показателями группы С, при отсутствии изменений почасового диуреза. Исследование уровня VEGF в сыворотке крове показало статистически значимое увеличение его концентрации во 2-й точке по сравнению с группой контроля С и содержанием в 1-й точке.

При морфологическом исследовании почек в группе контроля С в корковом веществе клубочки не изменены, просвет капсулы клубочка нормальный, состояние канальцев соответствует норме, в мозговом слое собирательные трубочки не изменены (рис. 2а). В группе А в 1-й точке в корковом слое отмечается расширение капилляров с признаками полнокровия, просвет капсулы клубочка нормальный, заполнен пролиферирующими клетками, просвет канальцев нефронов несколько расширен, заполнен единичными слущенными клетками эпителия, состояние стромы коркового и мозгового слоя не изменено (рис. 2б). Во 2-й точке в корковых нефронах обнаружены появления так называемых лапчатых клубочков, капилляры в клубочках расширены и полнокровны, базальные мембраны капилляров не изменены, просвет капсулы клубочков широкий. Состояние канальцев: просвет расширен, эпителий канальцев сохранен, состояние стромы коркового слоя не изменено, в сосудах отмечалось единичное плазмопропитывание (рис. 2в).

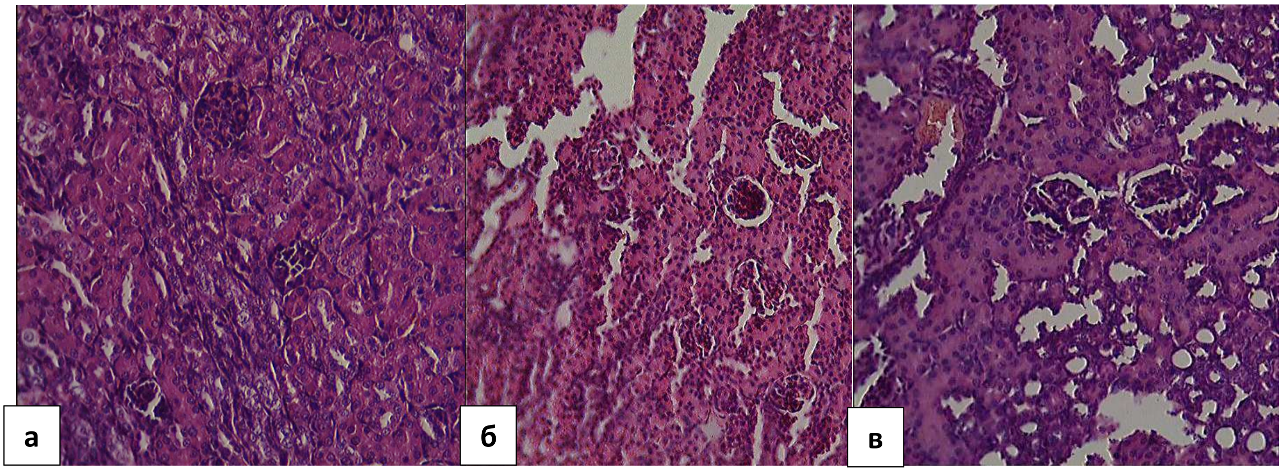

Рис. 2. Морфологические изменения в почках, окраска гематоксилин-эозин, объектив 40, окуляр 10: а - группа С (контроль), б – группа А в 1-й точке, в – группа А во 2-й точке

В группе В у крысят с индуцированной тяжелой степенью ИАГ в 1-й и 2-й точках исследования выявлены выраженная гипоксемия и гиперкапния (табл. 3). Установленные изменения газового состава крови связаны со значительным снижением объема минутной вентиляции легких вследствие интраабдоминальной гипертензии тяжелой степени и ограничения дыхательных движений диафрагмы. Анализ показателей КОС в крови показал наличие декомпенсированного смешанного ацидоза в обеих точках исследования. В условиях значимого повышения ИАД закономерно развивалась гиповентиляция легких, которая неизменно влекла за собой развитие гипоксемии, газового, а затем и метаболического ацидоза. Оценка уровня креатинина в сыворотке крови крысят этой группы показала статистически значимое его увеличение по сравнению с группой С (контроля) и с группой А (легкой степенью ИАГ) в обеих точках исследования на фоне снижения скорости почасового диуреза в два раза. Следует отметить, что в группе В у крысят с тяжелой степенью ИАГ на протяжении всего периода наблюдения зарегистрированы клинические проявления острой почечной недостаточности со снижением клубочковой фильтрации.

При исследовании содержания VEGF в сыворотке крови крысят группы В (с тяжелой степенью ИАГ) установлено значительное повышение его уровня в обеих точках исследования по сравнению с показателями групп С и А. Сравнительный анализ между 1-й и 2-й точкой в этой группе крысят показал нарастание содержания VEGF, коррелирующее с длительностью экспозиции индуцированной ИАГ тяжелой степени.

Кроме того, был произведен анализ корреляции между уровнем ИАД и концентрацией VEGF в сыворотке крови крысят групп А и В по сравнению с контролем в двух описанных ранее точках. Результаты, представленные в виде коэффициента корреляции Спирмена (r_s=0,748, $p<0,05$), свидетельствуют о наличии тесной корреляции между этими двумя показателями. Рост величины ИАД приводит к усугублению нарушений органно-тканевого кровотока, прогрессированию локальной гипоксии, которая инициирует усиление выработки VEGF (рис. 3).

Таблица 3

Данные комплекса обследования в группе В

Исследуемый показатель	**Группа С**	**Группа В**		**p**	p^*	$p^{\#}$	$p^{\#\#}$
		1-я точка	***2-я точка***				
	Me **LQ-UQ**	**Me** **LQ-UQ**	**Me** **LQ-UQ**				
pO_2, мм рт.ст.	84 81–86	45 38,5–56,5	45,5 42–49	0,0001	0,411	0,0001	0,0001
pCO_2, мм рт.ст.	43,5 42–47	56 48–67	53 49–56	0,0004	0,055	0,0001	0,0001
pH	7,34 7,32–7,35	7,29 7,258–7,301	7,28 7,775-7,302	0,0002	0,6	0,001	0,001
BE, ммоль/л	-1,5 -2–(-1)	-6 -7,5–(-4)	-8 -9–(-5,5)	0,0001	0,027	0,0001	0,0001
HCO_3^-, ммоль/л	18,5 17-21	22 18,5-24,5	13 11-14,5	0,035	0,0002	0,0001	0,903
Креатинин, мкмоль/л	76 67–83	169 117–177	177 160–191	0,06	0,126	0,0001	0,0001
VEGF, пг/мл	30 29–31	39 38-40	64 42 -65	0,0001	0,0008	0,0001	0,021
ИАД, мм рт.ст.	2 1-2,5	17 15-19	17,5 15-20	0,0001	0,569	0,0001	0,0001
Диурез, мкл/ч	17 13-20	9,5 5,5-11,5	10 6,5-11,5	0,0001	0,97	0,0002	0,0051

Примечание:

p – критерий достоверности различий Манна-Уитни показателей 2-й группы по отношению к показателям группы сравнения;

p^* – критерий достоверности различий Вилкоксона по отношению к показателям 1-й точки;

$p^{\#}$ – критерий достоверности различий Манна-Уитни показателей 2-й группы по отношению к показателям 1-й группы в 1-й точке;

$p^{\#\#}$ – критерий достоверности различий Манна-Уитни показателей 2-й группы по отношению к показателям 1-й группы в 1-й точке.

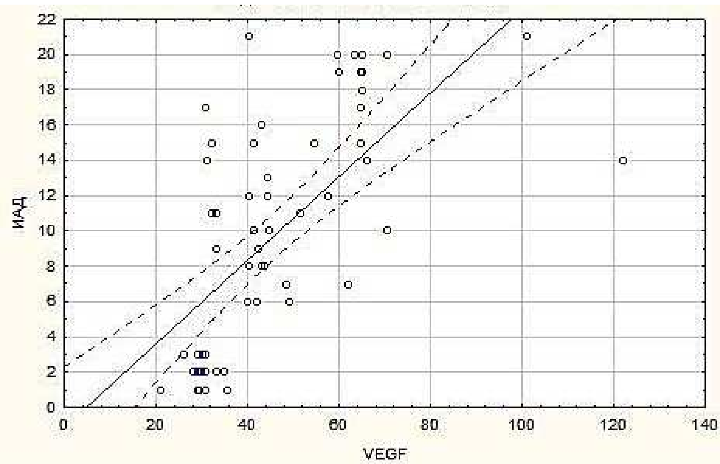

Рис. 3. Корреляция между уровнем ИАД и концентрацией VEGF (r_s=0,748, p <0,05)

При морфологическом исследовании почек крысят группы В (с тяжелой ИАГ) в 1-й точке выявлена гипертрофия клубочков нефрона, капилляры клубочков расширены, полнокровны. Просвет капсулы широкий, заполнен пролиферирующими клетками, просвет канальца нефрона расширен, заполнен слущенными клетками единичными эритроцитами. Базальная мембрана канальцев сохранена, строма коркового слоя отечна, местами инфильтрирована лимфоцитами, в строме мозгового слоя отмечена очаговая инфильтрация лимфоцитами (рис. 4).

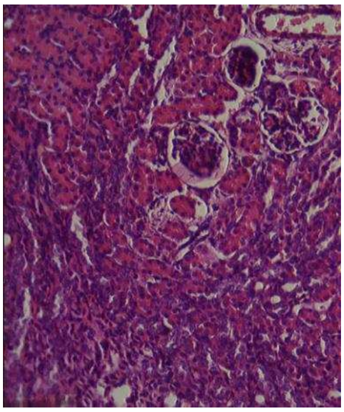

Рис. 4. Морфологические изменения в почках крысят группы В (с тяжелой степенью ИАГ) в 1-й точке исследования, окраска гематоксилин-эозин, объектив 40, окуляр 10

Во 2-й точке исследования в препаратах ткани почки группы В обнаружено появление гипертрофированных клубочков в корковом слое, капилляры клубочков расширены, полнокровны, просвет клубочка широкий, заполнен пролиферирующими клетками и единичными эритроцитами. Просвет канальцев расширен, эпителий местами некротизирован. Базальная мембрана канальцев сохранена, строма коркового вещества отечна, выявлена очаговая инфильтрация лимфоцитами и нейтрофилами, собирательные трубочки расширены, в просвете содержатся единичные лимфоциты и эритроциты. В лоханке обнаружены участки локальной атрофии уротелия. Морфологические изменения в паренхиме почек подтверждают нарушение органно-тканевого кровотока в условиях ИАГ тяжелой степени и прогрессируют по мере увеличения ее экспозиции.

Заключение

Таким образом, оценка показателей газового состава и кислотно-основного состояния, креатинина сыворотки крови, уровня VEGF, функциональных и морфологических изменений почек в условиях индуцированной ИАГ различной степени тяжести у новорожденных крысят позволила установить следующие закономерности.

1. Установлена патогенетическая взаимосвязь между повышением ИАД и нарушением органно-тканевого кровотока вследствие первичной компрессии почечных вен, что

сопровождается затруднением венозного оттока, расстройствами микроциркуляции и развитием локальной гипоксии.

2. Уровень ИАД коррелирует с увеличением содержанием VEGF в сыворотке, что обусловлено нарушением органно-тканевого кровотока в условиях ИАГ, прогрессированием локальной гипоксии, которая в свою очередь запускает усиление выработки VEGF подоцитами почек.

3. Изменения содержания VEGF выявляются раньше функциональных изменений почек, таких как снижение скорости почасового диуреза и повышение уровня креатинина, что подтверждает инициирующую роль гипоксии в механизмах повреждения почек.

4. Выявление нарастания уровня VEGF до клинических проявлений повреждения почек позволяет оценивать VEGF в качестве перспективного раннего маркера гипоксически-ишемического повреждения почечной паренхимы под действием повышенного ИАД у новорожденных.

Список литературы

1. Морозов Д.А., Филиппов Ю.В., Городков С.Ю. и др. Синдром интраабдоминальной гипертензии // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. - 2011. - Т. 170, № 1. - С. 97-101.
2. Плохих Д.А. Результаты исследования физиологических показателей внутрибрюшного давления у новорожденных детей // Мать и дитя в Кузбассе. – 2010. - № 2. – С. 30-33.
3. Федоров Д.А. Хирургическое лечение некротизирующего энтероколита у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии (экспериментально-клиническое исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Омск, 2013. - 23 с.
4. De Waele J.J., Leppäniemi A., De Keulenaer B.L. et al. Intra-abdominal hypertension and abdominal compartment syndrome in pancreatitis, paediatrics, and trauma // Anaesthesiol Intensive Ther. – 2015. – Vol. 47, № 3. – P. 219-27.
5. Kirkpatrick A.W., De Waele J.J., De Laet I. et al. WSACS - The Abdominal Compartment Society. A Society dedicated to the study of the physiology and pathophysiology of the abdominal compartment and its interactions with all organ systems // Anaesthesiol Intensive Ther. – 2015. - Vol. 47, № 3. – P. 191-194.
6. Köşüm A., Borazan E., Maralcan G. et al. Biochemical and histopathological changes of intra-abdominal hypertension on the kidneys: Experimental study in rats // Ulus Cerrahi Derg. – 2013. - № 2. - P. 49-53.

Рецензенты:

Брындина И.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии ГБОУ ВПО «Ижевская ГМА» Минздрава России, г. Ижевск;
Дьячкова С.Я., д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «ВГУ», г. Ижевск.