

На правах рукописи

Цыплаков Алексей Александрович

**МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ СИНДРОМЕ
ИНТРААБДОМИНАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ
(КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Саратов-2016

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Каждый третий ребенок, находящийся в критическом состоянии, имеет повышение интраабдоминального давления (ИАД), которое осложняет течение основной формы патологии и приводит к развитию полиорганной недостаточности [Liang Y.J. et al., 2015]. Летальность в группе детей с синдромом интраабдоминальной гипертензии (СИАГ) достигает 40–60% [Плохих Д.А., 2010; Ejike J.C. et al., 2011; Divarci E. et al., 2016]. Особую категорию больных представляют новорожденные, у которых развитие интраабдоминальной гипертензии (ИАГ) накладывается на критический период постнатальной адаптации ребенка [De Waele J.J. et al., 2015; Kirkpatrick A.W. et al., 2015]. Почки являются наиболее чувствительными органами к ИАГ: даже при сохранной системной гемодинамике в них отмечается снижение перфузионного давления [Сепбаева А.Д. и др., 2009; Abassi Z. et al., 2008; Sandhu G. et al., 2014], поэтому дальнейшее изучение молекулярно-клеточных патогенетических механизмов повреждения почек у детей с СИАГ имеет высокую научную и практическую значимость.

Сегодня в нашей стране в неонатальной практике отсутствуют единые стандарты диагностики ИАГ и мониторингования ИАД, своевременного выявления органных дисфункций. Раннее выявление острого повреждения почечной паренхимы является приоритетным направлением по разработке и внедрению новых персонализированных методов молекулярной диагностики и мониторингования повреждения почек у новорожденных с СИАГ, наиболее полно отображающих патологические процессы в почке.

Степень разработанности

Исключительно важную роль в патогенезе повреждения почек у новорожденных с СИАГ играют: компрессия почечных вен под действием повышенного ИАД [Райбужис Е.Н. и др., 2014] с развитием венозного полнокровия и нарушения микроциркуляции [Журавлева О.В., Золотухина О.А., 2010], рефлекторный спазм приносящих артериол, нарушение лимфотока и уродинамики под действие повышенного давления в мочевыводящих путях [Зорин И.В., 2010; Ricci Z., Ronco C., 2013]. Нарастание функциональной несостоятельности почек при СИАГ у новорожденных утяжеляет полиорганную недостаточность в целом, а повреждение почечной ткани может стать основой для развития хронической болезни почек во взрослом состоянии [Köşüm A. et al., 2013, Chadi S.A. et al., 2015]. Остается неизученным иницирующий механизм повреждения почечной паренхимы при ИАГ, не установлена взаимосвязь между величиной ИАГ и характером патологических

изменений в почках, не проанализированы точки приложения патогенных факторов на структурные компоненты нефрона. Не известно обратимы ли изменения в почках, и каковы их последствия для организма в целом, не выявлены ранние чувствительные маркеры их острого повреждения.

Цель исследования

Разработать новые патогенетические подходы к диагностике и мониторингованию почечной дисфункции у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии на основе уточнения ключевых молекулярных механизмов повреждения почечной паренхимы при интраабдоминальной гипертензии различной степени тяжести в клинике и эксперименте.

Задачи исследования

1. Установить ключевые механизмы повреждения почечной паренхимы при экспериментальной интраабдоминальной гипертензии у новорожденных крыс на основе сравнительной оценки показателей газового состава и кислотно-основного состояния крови, уровня васкуло-эндотелиального фактора роста (VEGF), креатинина, функциональных и морфологических изменений почек.

2. Проанализировать взаимосвязь между степенью повреждения почек по исследуемым параметрам и уровнем интраабдоминальной гипертензии, а также длительностью экспозиции интраабдоминальной гипертензии в эксперименте.

3. Выявить ключевые звенья патогенеза и особенности клинических проявлений почечной дисфункции у новорожденных с интраабдоминальной гипертензией различной длительности и степени тяжести.

4. Оценить уровни молекулярных маркеров: повреждения почек (π -глутатион-s-трансфераза (π -GST)), неоангиогенеза (васкулоэндотелиальный фактор роста), воспаления (моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1)) у новорожденных с интраабдоминальной гипертензией различной длительности и степени тяжести.

5. Провести сравнительную оценку чувствительности и значимости сдвигов ряда интегративных показателей повреждения почек у новорожденных с интраабдоминальной гипертензией различной длительности и степени тяжести в целях ранней диагностики почечной дисфункции.

Научная новизна

Получены принципиально новые данные относительно состояния почечной паренхимы у новорожденных крыс с экспериментальной ИАГ; установлен ключевой механизм повреждения почечной паренхимы при ИАГ; проанализирована взаимосвязь между повреждением почек, степенью повышения ИАД и длительностью ИАГ по данным изменения содержания молекулярных маркеров повреждения почек, морфологических и

морфометрических данных; прослежена динамика изменения маркеров острого повреждения почек в зависимости от степени тяжести и длительности экспозиции ИАГ. Впервые выполнен комплексный анализ содержания молекулярных маркеров: π -GST, VEGF, MCP-1 у новорожденных с ИАГ различной длительности и степени тяжести. Установлена высокая значимость неинвазивного исследования в моче маркеров для оценки состояния почечной паренхимы до появления клинических проявлений органной дисфункции. Впервые на основании детального изучения механизмов повреждения почек предложен новый методологический подход и алгоритм диагностики и мониторинга органной дисфункции у новорожденных с ИАГ различной длительности и степени тяжести.

Теоретическая и практическая значимость

Установлены закономерности повреждения различных структурных компонентов почек в условиях экспериментальной ИАГ различной степени тяжести и длительности, выделен иницирующий механизм повреждения почечной паренхимы в условиях ИАГ, который может быть экстраполирован на неонатальный период.

Дано теоретическое обоснование перспективам применения ключевых молекулярно-клеточных маркеров инициации начальных этапов повреждения почек в условиях ИАГ в клинической практике, что позволит повысить точность ранней диагностики, персонализированной терапии и профилактики повреждения почек у новорожденных с СИАГ. Выделены наиболее информативные молекулярные маркеры повреждения почек у новорожденных, наиболее полно отображающие патологические процессы в органе при различных уровнях ИАД, для неинвазивной оценки состояния почечной паренхимы до появления клинических проявлений органной дисфункции. Полученные данные являются основой для разработки методов ранней диагностики, персонализированного лечения и профилактики осложнений данной патологии в широкой клинической практике.

Связь с планом научного направления

Диссертационное исследование выполняется в рамках научного направления кафедры патологической физиологии им. академика А.А. Богомольца ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России «Разработка новых технологий и алгоритмов диагностики и лечения больных с различной патологией органов мочеполовой системы на основе фундаментальных исследований», номер государственной регистрации 01200959766.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ключевыми звеньями патогенеза повреждения почек при интраабдоминальной гипертензии являются нарушение органно-тканевого кровотока и развитие локальной гипоксии, тяжесть которой пропорциональна морфофункциональным изменениям в почках.

2. Изменения содержания VEGF в сыворотке крови экспериментальных животных коррелируют со степенью и длительностью экспозиции ИАГ, выявляются раньше функциональных изменений почек, таких как снижение скорости почасового диуреза и повышение уровня креатинина.

3. Увеличение содержания π -GST в моче у новорожденных с СИАГ свидетельствует о повреждении дистальных канальцев почек и пропорционально степени повышения ИАД. После декомпрессии брюшной полости содержание π -GST в моче сохраняется на высоком уровне, что подтверждает наличие периода восстановления молекулярно-клеточных повреждений нефрона, возникающих на фоне СИАГ, при отсутствии клинических проявлений органной дисфункции.

4. Инициальными звеньями повреждения почек при СИАГ у новорожденных являются нарушение регионарного кровотока (снижение максимальной систолической скорости кровотока, увеличение индекса резистивности при доплерометрии) и развитие локальной гипоксии, индуцирующей увеличение синтеза VEGF подоцитами и повышение его уровня в моче.

Методология и методы исследования

Работа включала два этапа: экспериментальный и клинический.

I этап: экспериментальный, включал в себя:

1. Моделирование ИАГ у новорожденных крыс различной длительности и степени тяжести.
2. Оценка морфологических изменений в почках под действием ИАГ.
3. Оценка гомеостаза и выделительной функции почек.
4. Анализ взаимосвязи динамики изменения уровня VEGF в сыворотке крови с уровнем ИАГ различной экспозиции и морфофункциональными изменениями почек.

II этап: клинический, включал в себя:

1. Определение роли биомаркеров повреждения почечной паренхимы, неоангиогенеза и воспаления в механизмах повреждения почек при СИАГ:
 - группа больных с гастрошизисом,
 - группа больных с ложной диафрагмальной грыжей,
 - группа больных с атрезией пищевода с дистальным ТПС,

– группа сравнения (клинически здоровые новорожденные).

2. Разработка перспективной молекулярной биопанели неинвазивной ранней диагностики нарушения функции почек при СИАГ.

Методы, использованные при проведении экспериментов. Всем группам животных проводился комплекс обследования: анализ газового (PaO_2 , PaCO_2), кислотно-основного (pH^+ , HCO_3^- , ВЕ, анионный пробел), концентрации креатинина крови с помощью анализатора i-STAT (Abbott, США), уровня VEGF в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Просмотр биопсийного материала и его фотосъемка осуществлялись на микроскопе Leika DM2000 с встроенной цифровой фотокамерой. Морфометрические показатели получали при обработке цифровых фотографий с помощью специальной программы для морфометрического и структурного анализа изображений Image-Pro Premier 9.0.

Методы, использованные на клиническом этапе исследования. Стандартный комплекс исследования включал: инструментальный мониторинг артериального давления, электрокардиографию, измерение центрального венозного давления, температуры тела, темпа диуреза, анализ газового (PaO_2 , PaCO_2 , SaO_2), кислотно-основного (pH , HCO_3^- , ВЕ, анионный пробел), с использованием мультисистемного анализатора RapidLab 348, Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (США); биохимические показатели крови (мочевина, креатинин, общий белок, альбумин, общий и прямой билирубин, аминотрансферазы) с помощью автоматического биохимического анализатора EasyRA с ионоселективным блоком (Medica Corp., США); общий анализ крови и мочи, ультразвуковое сканирование почек с доплерометрией на аппаратах AU4 Idea (Esaote S.p.A., Италия), Logiq 500 (GE HC, США), Acuson Sequoia (Siemens, Германия).

Количественное определение π -GST, MCP-1, VEGF в сыворотке крови и моче осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем BCM Diagnostics и Bender Medsystems (Австрия) на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2010 (Stat Fax, США).

Комплекс стандартных и специальных методов исследования был зарегистрирован в трех точках: при поступлении пациента в стационар, до коррекции порока (1-я точка исследования), на 4-е сутки (2-я точка исследования) и на 10-е сутки после хирургической коррекции порока (3-я точка исследования).

Статистический анализ результатов обследования и лечения пациентов проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 for Windows корпорации StatSoft-Russia, GraphPad Prism 6 for Windows корпорации GraphPad Software (США), Microsoft Office Exelle 2013.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно разработал методические подходы к решению поставленных задач, выполнил экспериментальные и клинические исследования, провел статистическую обработку и анализ с обобщением полученных результатов.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: IV Всероссийской неделе медицинской науки с международным участием (Саратов, 2015); XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей, посвященной двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2015); 16-м Европейском конгрессе детских хирургов (Словения, Любляна 2015); I съезде детских хирургов России (Москва, 2015); XVIII Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2015); VI Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015» (Санкт-Петербург, 2015); IV Всероссийской конференции «Неотложная детская хирургия и травматология» в рамках XIX Конгресса педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 2016); VI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2016).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты научного исследования внедрены в практику работы отделений реанимации новорожденных и анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии ГУЗ «Саратовская областная детская клиническая больница», а также используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедрах патофизиологии у студентов 3, 5, 6-х курсов педиатрического, лечебного, медико-профилактического факультетов ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России и ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в которых изложены основные результаты исследования, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Степень достоверности результатов исследования

Высокая достоверность результатов исследования обеспечена достаточным объемом и адекватным подбором объектов наблюдения

клинического и экспериментального этапов, формированием анализируемой выборки в режиме стратифицированной рандомизации, разделением признаков на количественные и качественные, использованием современных методов сбора и статистической обработки информации, сопоставимостью полученных результатов исследования с литературными данными.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 176 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 22 таблицами и 26 рисунками. Список литературы содержит 186 источников, из них – 57 отечественных и 129 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика экспериментальных животных. Исследования экспериментального этапа работы выполнялись в Центре коллективного пользования на базе ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России. Все манипуляции с животными проводились с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными: Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г.), 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»); Кодексом федеральных регламентов FDA (Code of Federal Regulations, CFR), 1979 г.

В исследование были включены 100 новорожденных крыс, разделенных на пять групп:

- группа 1 (n = 20) – новорожденные крысы, которым моделировалась легкая степень ИАГ (ИАД = 6–13 мм рт. ст.) с экспозицией 3 суток.
- группа 2 (n = 20) – новорожденные крысы, которым моделировалась легкая степень ИАГ (ИАД = 6–13 мм рт. ст.) с экспозицией 8 суток.
- группа 3 (n = 20) – новорожденные крысы, которым моделировалась тяжелая ИАГ (ИАД = 14–20 мм рт. ст.) продолжительностью 3 суток.
- группа 4 (n = 20) – новорожденные крысы, которым моделировалась тяжелая ИАГ (ИАД = 14–20 мм рт. ст.) продолжительностью 8 суток.
- группа 5 (n = 20) – новорожденные крысы, которым однократно была произведена пункция брюшной полости под наркозом.

Моделирование повышенного ИАД у малых лабораторных животных осуществлялось путем введения в брюшную полость объемообразующего препарата коллагена по способу Д.А. Федорова [Федоров Д.А., 2013]. Выполнялась пункция брюшной полости и введение препарата коллагена в объеме, необходимом для создания заданного уровня ИАГ, под контролем интравезикальной манометрии [Kron I.L. et al., 1984].

Характеристика клинического материала. Было обследовано 35 новорожденных с СИАГ, находившихся на лечении в клинике детской хирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, в соответствии с приказом ФМБА РФ от 30.03.2007 г. № 88 и ст. 20 Федерального закона от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Критериями исключения пациентов были: возраст старше 28 дней, интеркуррентные формы воспалительного процесса, а также отказ родителей от участия в обследовании.

В зависимости от формы врожденного порока развития, приводящего к формированию СИАГ, все больные были разделены на три группы: в 1-ю группу вошли 14 новорожденных с гастрошизисом, 2-ю группу составили 13 новорожденных с ложной диафрагмальной грыжей, в 3-ю группу включены 8 новорожденных с атрезией пищевода с широким дистальным трахеопищеводным свищом (ТПС), находившихся на искусственной вентиляции легких (средний возраст при поступлении в стационар $2,2 \pm 0,9$ сут). Группу сравнения составили 20 новорожденных, стратифицированных по полу и возрасту, без СИАГ и патологии мочевыводящих путей, поступивших на плановое оперативное лечение по поводу гемангиомы или малого омфалоцеле (средний возраст $10,4 \pm 3,1$ сут).

Учитывая рекомендации международной группы экспертов по интраабдоминальной гипертензии и абдоминальному компартмент-синдрому, измерение ИАД у пациентов всех групп осуществлялось путем интравезикальной манометрии во всех точках исследования, результаты представляли в миллиметрах ртутного столба [World Society of the Abdominal Compartment Syndrome, 2005; Забелин М.В., 2010; Defontaine A. et al., 2016].

Результаты исследования и их обсуждение

Экспериментальный этап. В 1-й группе у крысят с легкой степенью ИАГ с экспозицией 3 суток не отмечалось достоверных изменений показателей гомеостаза, не было зафиксировано проявлений почечной недостаточности, уровень VEGF сыворотки крови не отличался от показателей контрольной группы. При морфологическом исследовании почек отмечались невыраженные структурные изменения (рис. 1). Морфометрические показатели достоверно не отличались от измерений в контрольной группе (табл. 1).

Результаты морфометрического исследования почек

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	Контрольная группа
	Me	Me	Me	Me	Me
	LQ-UQ	LQ-UQ	LQ-UQ	LQ-UQ	LQ-UQ
Короткая ось клубочка, мкм	0,159 0,151–0,164	0,166* 0,161–0,168	0,170* 0,168–0,175	0,183* 0,178–0,186	0,152 0,148–0,157
Длинная ось клубочка, мкм	0,195 0,189–0,201	0,210 0,203–0,214	0,220* 0,212–0,225	0,234* 0,224–0,238	0,196 0,191–0,199
Высота эпителия канальцев, мкм	0,037 0,031–0,042	0,039 0,033–0,042	0,041* 0,035–0,045	0,044* 0,038–0,046	0,034 0,031–0,039

Примечание: * – $p < 0,05$ критерий достоверности различий Краскела – Уоллиса по отношению к контрольной группе с поправкой Данна для множественных сравнений.

Во 2-й группе крысят с легкой степенью ИАГ, с экспозицией 8 суток также не отмечалось достоверных изменений показателей гомеостаза и проявлений почечной недостаточности. Однако уровень VEGF в сыворотке крови был достоверно выше показателей контрольной и 1-й групп.

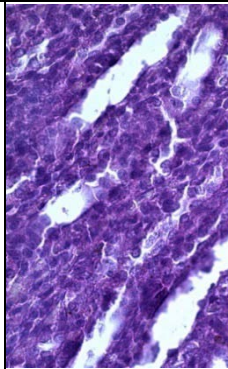
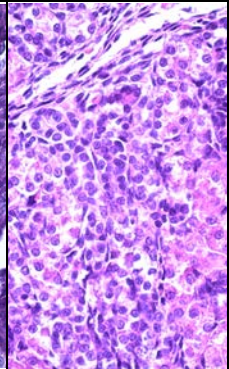
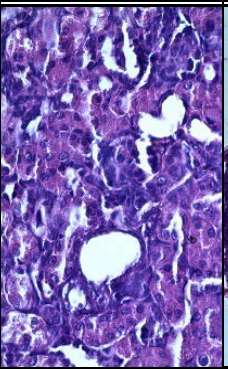
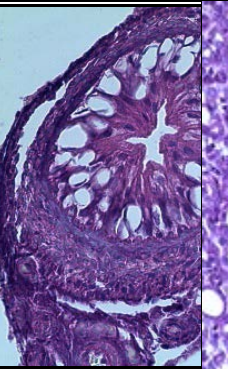
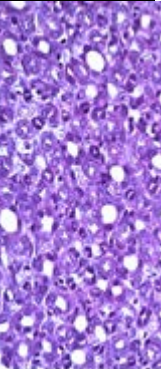
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	5-я группа (контроль)
ИАД, мм рт. ст.	8,95 ± 2,06	9,3 ± 2,23	17,45 ± 2,52	16,95 ± 2,44	1,95 ± 0,76
Темп диуреза, мкл/час	14 (12–18)	13 (10–17)	10* (6–12)	10* (7–12)	17 (13–20)
Креатинин, мкмоль/л	84 (74–98)	89 (75–102)	169* (117–177)	177* (160–191)	76 (67–83)
VEGF, пг/мл	31 (28–35)	43* (41–49)	39* (37–41)	64* (42–65)	30 (29–31)
Фотографии морфологических препаратов почки, х 400					

Рис. 1. Результаты морфологического исследования почек, динамика VEGF крови, функциональные проявления почечной недостаточности (* – $p < 0,05$ критерий достоверности различий Краскела – Уоллиса по отношению к контрольной группе с поправкой Данна для множественных сравнений)

При исследовании биоптатов зарегистрированы более выраженные морфологические изменения (рис. 1): незначительное расширение мочевого пространства гломерул; начальные проявления гидрорической дистрофии эпителия в группах проксимальных извитых канальцев, расположенных вблизи междольковых вен коркового слоя; более значительное расширение просветов собирательных трубочек мозгового слоя и слущивание эпителия в их просветы. Морфометрические показатели подтверждали визуальные данные: размер короткой оси клубочка статистически значимо выше, чем в контрольной группе (табл. 1).

В 3-й группе с тяжелой степенью ИАГ, с экспозицией 3 суток отмечались: существенная гипоксемия, гиперкапния и смешанный декомпенсированный ацидоз, гиперазотемия и снижение скорости диуреза. При исследовании VEGF в сыворотке крови установлено статистически значимое повышение по отношению к контрольной группе ($p_k = 0,001$). Морфологическая картина в препаратах почек крыс 3-й группы принципиально не отличалась от микроскопии 2-й группы, однако при морфометрии отмечено более выраженное увеличение размеров клубочка и гидрорической дистрофии эпителия (рис. 1, табл. 1).

В 4-й группе, где экспозиция тяжелой ИАГ продолжалась 8 суток, выявлены выраженная гипоксемия и гиперкапния; декомпенсированный смешанный ацидоз, увеличение уровня креатинина до 176,5 (160–191) мкмол/л, $p_k < 0,001$, снижение темпа диуреза в два раза до 10 (7–12) мкл/час, $p_k < 0,001$.

При исследовании VEGF в сыворотке крови зафиксировали максимальное повышение данного биомаркера по отношению к контрольной ($p_k < 0,001$) и другим группам исследования 64 (42–65) пг/мл, $p_{4vs1} < 0,001$, $p_{4vs2} < 0,001$, $p_{4vs3} = 0,086$. В биоптатах обнаружены наиболее выраженные морфологические изменения (рис. 1): более значительное расширение мочевого пространства гломерул, кистозное расширение просветов части проксимальных и дистальных извитых канальцев преимущественно в поверхностных отделах коркового слоя, выраженные гидрорические изменения по типу баллонной дегенерации эпителия единичных канальцев в этой же зоне, значительное расширение просветов собирательных трубочек мозгового слоя; разрыхление и отек интерстиция на границе коркового и мозгового слоев. Данные визуального описания соответствовали результатам морфометрического исследования (табл. 1).

Таким образом, значительное повышение ИАД сопровождалось нарушением выделительной функции почек, клинически проявляющимся увеличением концентрации креатинина в сыворотке крови и снижением скорости почасового диуреза, что связано с нарушением органно-тканевого

кровотока в условиях ИАГ и подтверждалось данными морфологического исследования и морфометрии. Подобные изменения были приведены в эксперименте на беспородных крысах [Köşüm A. et al., 2013]. Увеличение содержания VEGF в сыворотке крови экспериментальных животных коррелировало с повышением ИАД и длительностью экспозиции ИАГ, выявлялось раньше стандартных клинических проявлений почечной недостаточности (снижения скорости почасового диуреза и повышения уровня креатинина в сыворотке крови). В литературе имеются данные о повышении концентрации VEGF в моче еще до появления альбумина у пациентов с артериальной гипертензией и нефропатией [Нанчикеева М.Л., 2010]. Взаимосвязь изменения данного биомаркера с длительностью и тяжестью ИАГ была установлена нами впервые.

Установленные закономерности повреждения почек при экспериментальной ИАГ различной степени тяжести и длительности позволяют рекомендовать VEGF в качестве перспективного раннего маркера гипоксически-ишемического повреждения почечной паренхимы под действием повышенного ИАД у новорожденных.

Клинический этап. В 1-й группе у новорожденных с гастрошизисом в 1-й точке при исходно нормальном уровне ИАД показатели газового состава крови, гомеостаза, азотемии, темпа диуреза, данные почечного кровотока, а также изменения уровней биомаркеров в моче и крови достоверно не отличались от группы сравнения. Во 2-й точке (на 4-е сутки после коррекции порока) зарегистрированы максимальные изменения биомаркеров в сыворотке крови (MCP-1 399 (392–404) пг/мл, $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} = 0,17$; VEGF 137 (134–142) пг/мл $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$) и моче (π -GST 11,5 (10–12) мкг/л $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$; MCP-1 419 (385–467) пг/мл; VEGF 173 (168–175) пг/мл $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$). Уровень ИАД достигал 22 (20–25) мм рт. ст., $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$ (рис. 2). Одновременно отмечались: гипоксемическая гипоксия со снижением PaO_2 и степени насыщения гемоглобина кислородом, декомпенсированный смешанный ацидоз с увеличенным анионным пробелом, повышение уровня креатинина до 111 (98–125) мкмоль/л, $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$, снижение темпа диуреза до 0,55 (0,4–0,8) мл/кг в час, $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} = 0,03$. При доплерометрии почечного кровотока на уровне ствола почечной артерии выявлено достоверное снижение максимальной систолической скорости кровотока, увеличение индекса резистивности (рис. 3). На 10-е сутки после коррекции порока наблюдались снижение ИАД практически в два раза, нормализация газового состава крови, уровня креатинина в сыворотке крови, восстановление почасового диуреза. При этом содержание всех биомаркеров в сыворотке крови и

моче оставалось повышенным по отношению к группе сравнения, но несколько снижалось по сравнению с данными во 2-й точке исследования (рис. 2).

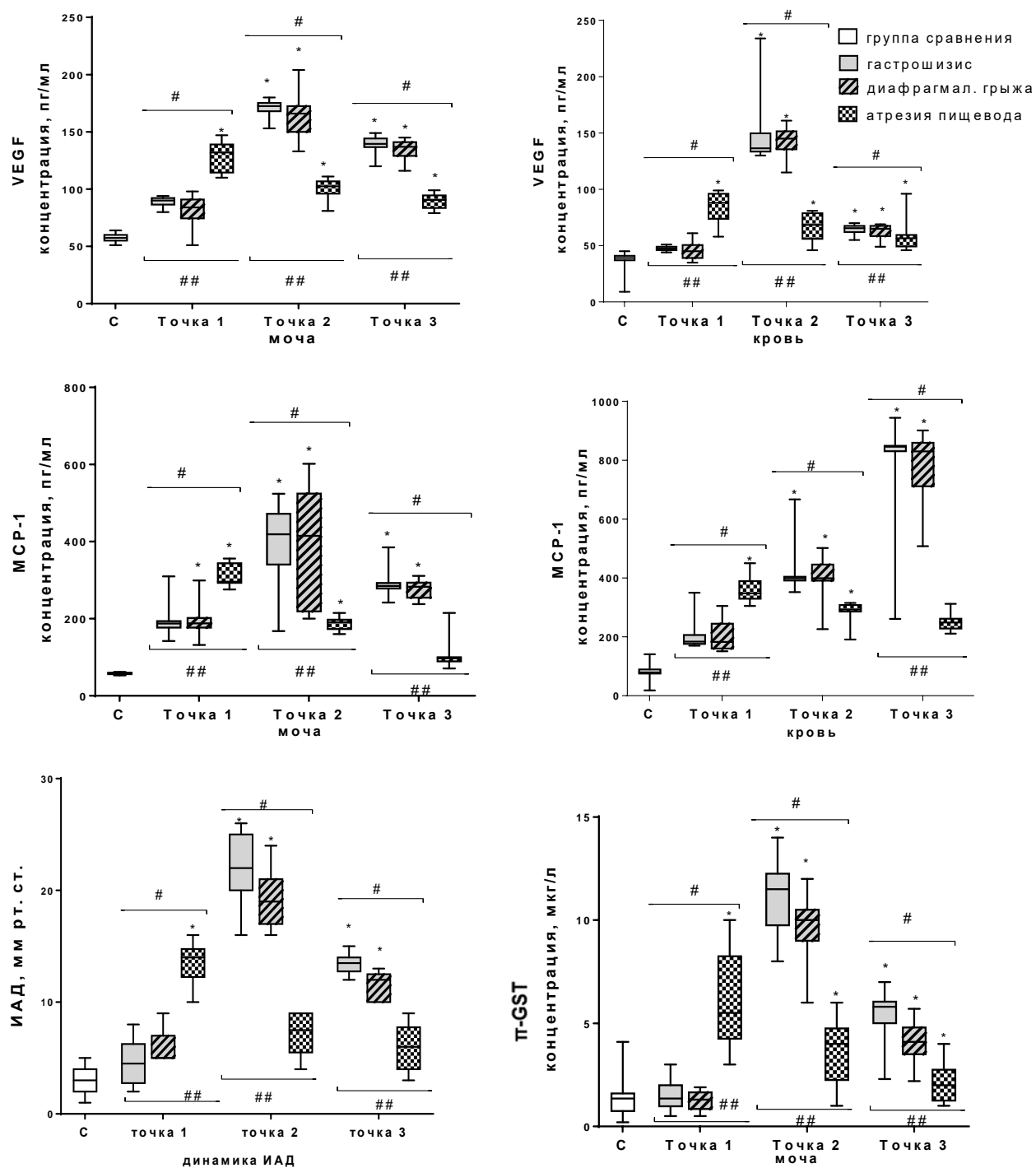


Рис. 2. Динамика изменения биомаркеров в крови и моче, динамика изменения ИАД у разных групп (С – показатели группы сравнения, * – $p < 0,05$ критерий достоверности различий по отношению к показателям группы сравнения. # – $p_{3vs1} < 0,05$ – критерий достоверности различий Краскела–Уоллиса между показателями 3-й и 1-й группами в аналогичной точке исследования. ## – $P_{3vs2} < 0,05$ – критерий достоверности различий Краскела – Уоллиса между показателями 3-й и 2-й группами в аналогичной точке исследования, критерии достоверности рассчитаны с поправкой Данна для множественных сравнений)

У новорожденных этой группы отмечалась четкая взаимосвязь изменения уровня ИАД в динамике заболевания и повышением концентрации MCP-1 и VEGF как в сыворотке крови, так и еще более выраженным повышением их содержания в моче, наряду с увеличением концентрации π -GST в моче. Сдвиги биомаркеров в моче сохранялись и после декомпрессии брюшной полости и купирования клинических проявлений почечной недостаточности.

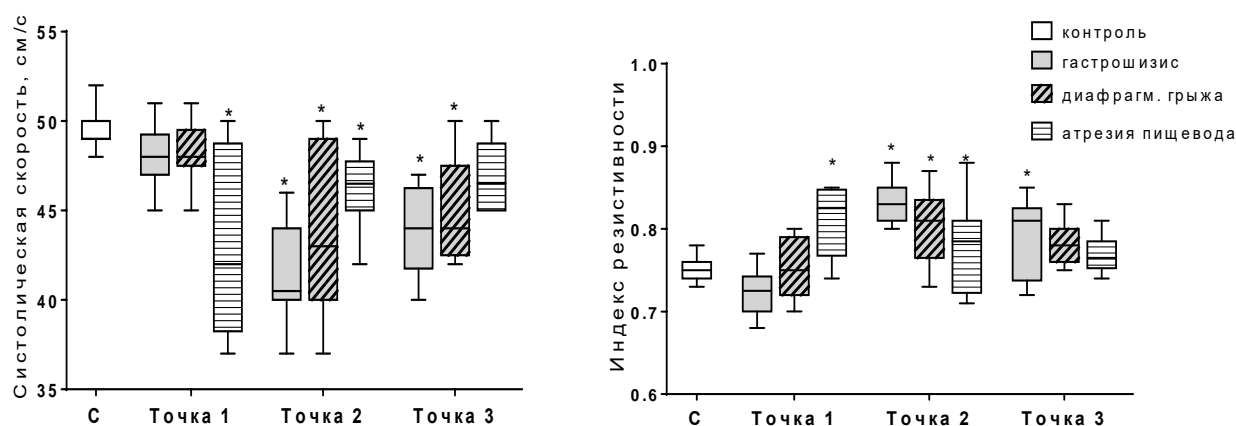


Рис. 3. Показатели почечного кровотока по данным доплерометрического исследования (* – $p_c < 0,05$, критерий достоверности различий по отношению к группе сравнения)

Новорожденные 2-й группы с врожденной ложной диафрагмальной грыжей поступали в стационар (1-я точка) в тяжелом состоянии с декомпенсированной гипоксемически-гиперкапнической гипоксией, некомпенсированным смешанным ацидозом. Исходный уровень ИАД, показатели азотемии, темпа диуреза, данные почечного кровотока и содержание биомаркеров в моче и крови достоверно не отличались от показателей группы сравнения, кроме повышения уровня MCP-1 мочи до 188 (184–201) пг/мл, $p_c < 0,01$ (рис. 2). Во 2-й точке зарегистрированы максимальные изменения биомаркеров в сыворотке крови: MCP-1 399 (397–421) пг/мл, $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} = 0,29$; VEGF 145 (140–151) пг/мл, $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$ и моче: π -GST 10 (9–10) мкг/л $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$; MCP-1 415 (219–499) пг/мл, $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} = 0,01$; VEGF 166 (151–172) пг/мл, $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$. Уровень ИАД достигал 19 (17–21) мм рт. ст., $p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$ (рис. 2). Одновременно установлены максимальные сдвиги показателей газового состава крови, кислотно-основного состояния и снижения скорости органного кровотока на уровне ствола почечной артерии, повышения индекса резистивности (рис. 3). Выявлены увеличение уровня креатинина до 91 (83–105) мкмоль/л ($p_c < 0,01$, $p_{2vs1} < 0,01$) и снижение темпа диуреза до 1,4 (1,2–1,5) мл/кг в час, ($p_c < 0,01$, $p_{2vs1} = 0,07$). На 10-е сутки после коррекции порока происходили уменьшение

степени гипоксии, смешанного ацидоза, восстановление скорости почасового диуреза и уровня креатинина сыворотки крови до возрастной нормы.

Величина ИАД также значительно снижалась, а концентрации биомаркеров в сыворотке крови и моче сохранялись повышенными. Отличительной чертой 2-й группы новорожденных явилось более выраженное изменение исходных концентраций VEGF и MCP-1 в сыворотке крови. Повышение ИАД в послеоперационном периоде связано с перемещением кишечника из грудной полости в гипоплазированную брюшную полость. Изменения биомаркеров в сыворотке крови и моче в послеоперационном периоде у пациентов 2-й группы были аналогичны сдвигам их содержания у больных 1-й группы и коррелировали с динамикой изменения ИАД. Сохранение сдвигов биомаркеров в 3-й точке исследования, так же как и у новорожденных 1-й группы, подтверждает факт повреждения почек на фоне СИАГ и необходимости восстановительного периода молекулярно-клеточных структур, возникающих на фоне ишемии.

В 3-й группе новорожденных с атрезией пищевода с широким дистальным ТПС и искусственной вентиляцией легких уже при поступлении (1-я точка) были установлены изменения газового состава крови: гипоксемия, компенсированный смешанный ацидоз на фоне умеренного повышения ИАД до 14 (13–15) мм рт. ст., $p_c < 0,01$. Одновременно было зарегистрировано увеличение концентрации в сыворотке крови: MCP-1 348 (335–378) пг/мл $p_c < 0,01$, VEGF 88 (77–95) пг/мл, $p_c < 0,01$ и моче: π -GST 5,5 (4,3–8,3) мг/л, $p_c < 0,01$, MCP-1 296 (293–333) пг/мл, $p_c < 0,01$; VEGF 132 (117–137) пг/мл, $p_c < 0,01$ (рис. 2).

Скорость почасового диуреза и содержание креатинина и мочевины в крови были в пределах возрастной нормы. На 4-е сутки после коррекции порока в этой группе новорожденных отмечалось снижение ИАД до 7,5 (6–9) мм рт. ст., $p_c = 0,054$, $p_{2vs1} = 0,40$, а уровень биомаркеров оставался повышенным (рис. 2). Анализ газового состава капиллярной крови показал наличие дыхательной гипоксии и некомпенсированного смешанного ацидоза. Признаков почечной недостаточности выявлено не было. При доплерометрии почечного кровотока значимых изменений на уровне ствола почечной артерии не установлено (рис. 3). На 10-е сутки после операции содержание биомаркеров сохранялось повышенным как в сыворотке крови, так и в моче, несмотря на значительное снижение ИАД до 3 (2–4) мм. рт. ст., $p_c = 0,88$, $p_{3vs1} = 0,016$. Скорость почасового диуреза и содержание креатинина и мочевины не отличались от показателей группы сравнения. Значимых сдвигов газового состава крови и кислотно-основного состояния выявлено не было. У новорожденных 3-й группы максимальное повышение всех исследуемых

маркеров было зарегистрировано в 1-й точке на фоне умеренного повышения ИАД при нормальных показателях креатинина и темпа диуреза, минимальным было в 3-й точке, когда ИАД снижалось в два раза. В этой группе больных повышение ИАД было умеренным и кратковременным (не более суток) при поступлении в стационар, однако даже в этих условиях регистрировались признаки повреждения почек на молекулярно-клеточном уровне.

Таким образом, данные стандартного комплекса клиничко-лабораторно-инструментальных исследований позволили подтвердить у обследованных нами пациентов почечную недостаточность в рамках СИАГ у пациентов 1-й и 2-й группы, где значения ИАД были максимальны.

Для выявления патогенетической взаимосвязи между нарушением функции почек и степенью тяжести СИАГ, а также создания перспективной диагностической модели с целью определения ранних признаков ишемической нефропатии, индуцированной ИАГ, был проведен корреляционный анализ между уровнем ИАД и изменением показателей стандартного комплекса клиничко-лабораторных, инструментальных методов исследования пациентов, биомаркеров повреждения почечной паренхимы. Повышение уровня ИАД имело тесную отрицательную корреляционную взаимосвязь со снижением скорости почасового диуреза (критерий Спирмена $r_s = -0,713$, $p < 0,05$) и тесную положительную связь с концентрацией креатинина в сыворотке крови (критерий корреляции Спирмена $r_s = 0,729$, $p < 0,05$).

Во всех группах новорожденных с СИАГ выявлено достоверное увеличение содержания π -GST в моче, тесно коррелирующее со степенью повышения ИАД ($r_s = 0,769$, $p < 0,05$), что подтверждает факт повреждения дистальных канальцев почек (рис. 4).

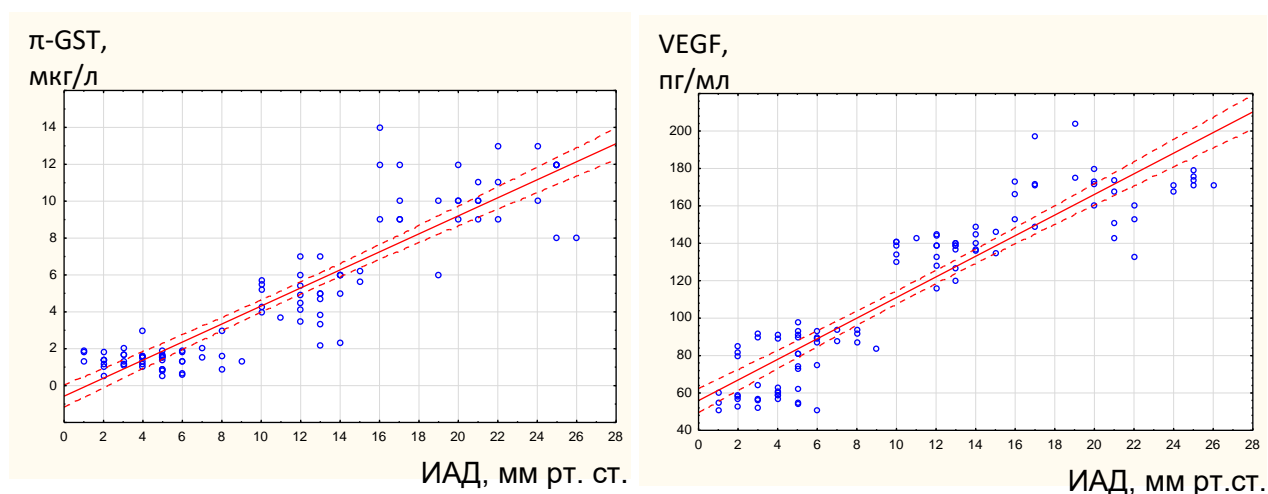


Рис. 4. Корреляция Спирмена между уровнем ИАД и VEGF в моче; ИАД и π -GST в моче

После декомпрессии брюшной полости содержание π -GST в моче оставалось повышенным до 10-х суток после коррекции порока, что позволяет предположить необходимость длительного периода восстановления молекулярно-клеточных повреждений нефрона, возникающих на фоне СИАГ даже при отсутствии клинических проявлений нефропатии. Во всех группах новорожденных с СИАГ выявлено достоверное увеличение содержания VEGF в моче (рис. 4), коррелирующее со степенью повышения ИАД ($r_s = 0,894$, $p < 0,05$), что подтверждает гипотезу ишемического повреждения почечных клубочков при СИАГ. После декомпрессии брюшной полости содержание VEGF в моче оставалось повышенным до 10-х суток после коррекции порока, что свидетельствует о долгих последствиях ишемического эпизода в гломерулярном аппарате нефрона, возникающего на фоне СИАГ при отсутствии клинических проявлений нефропатии. При сопоставлении значений концентрации провоспалительного хемокина MCP-1 в сыворотке крови и моче у разных групп новорожденных в динамике исследования отмечена взаимосвязь изменения данного биомаркера пропорционально степени повышения ИАД вне зависимости от нозологической группы.

Диагностика СИАГ у новорожденных происходит субъективно, в основном путем физикального исследования, что зачастую приводит к недооценке уровня ИАД и несвоевременному выявлению осложнений. Раннее выявление острого повреждения почечной паренхимы является сложной задачей из-за морфофункциональных особенностей и высокой чувствительности почек новорожденных к повышению ИАД. Важным шагом на пути к повышению точности ранней диагностики, персонализированной терапии и профилактики повреждения почек у новорожденных с СИАГ является поиск оптимальных комбинаций биомаркеров, полно отображающих патологические процессы в почке при различных уровнях ИАД, что позволит своевременно скорректировать тактику хирургической коррекции порока, объективно мониторировать динамику восстановления органной функции. Опираясь на данные корреляционного анализа, который подтвердил диагностическую значимость маркеров повреждения дистальных канальцев почек, а также факторов ангиогенеза, был создан алгоритм ранней не инвазивной диагностики повреждения почек у новорожденных с СИАГ и выбора тактики хирургической коррекции порока, который позволит стандартизировать подходы к оценке начальных этапов почечной дисфункции, мониторировать динамику изменения и оптимизировать подходы ведения пациентов с данной патологией (рис. 5).

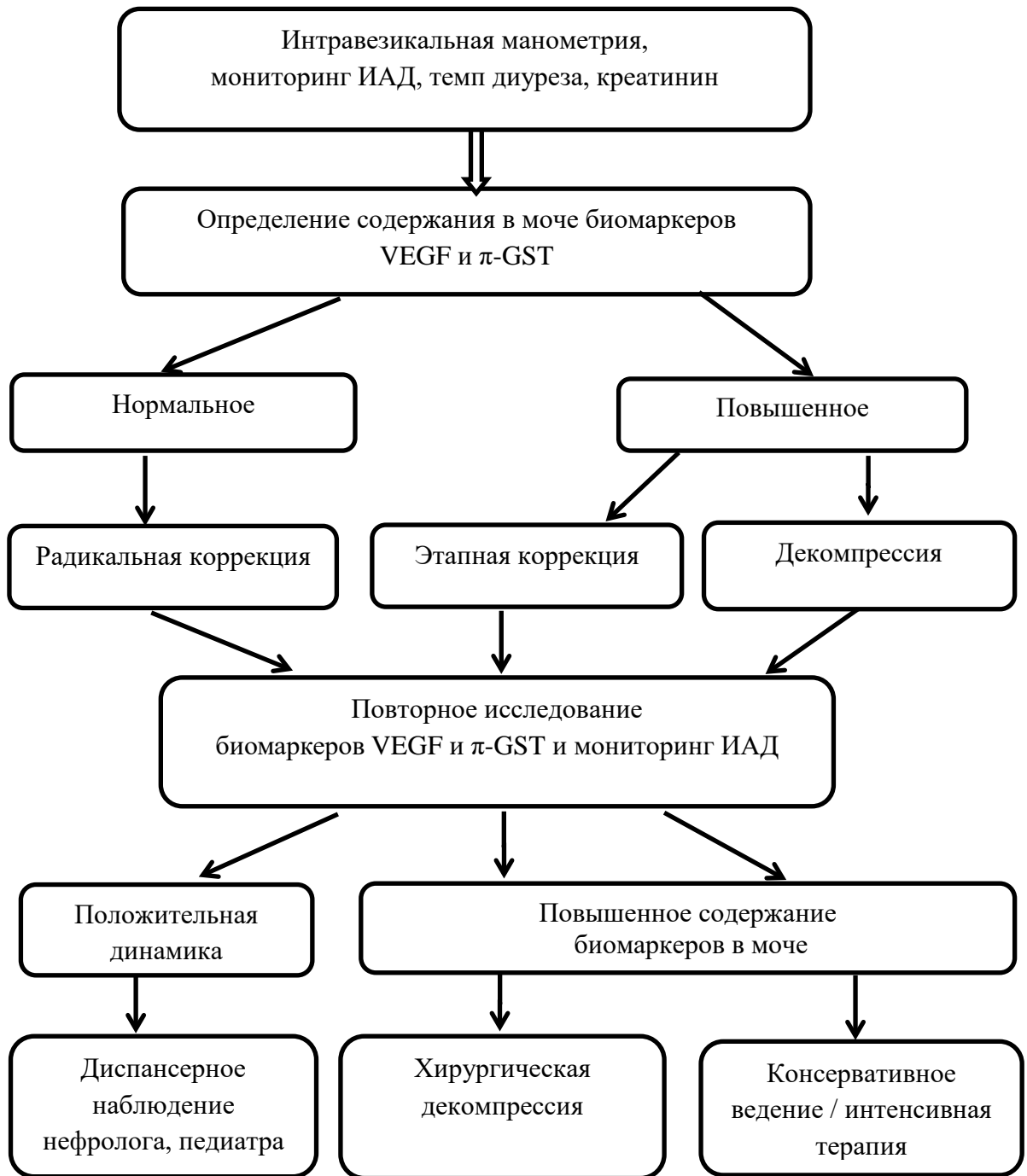


Рис.5. Алгоритм ранней диагностики повреждения почек у новорожденных с СИАГ и выбора тактики хирурга, диспансерное наблюдение нефролога, педиатра

ВЫВОДЫ

1. Важная роль в механизмах повреждения почечной паренхимы в условиях экспериментальной интраабдоминальной гипертензии принадлежит локальной гипоксии, возникающей вследствие нарушения органно-тканевого кровотока при первичной компрессии почечных вен, затруднении венозного оттока, расстройств микроциркуляции, что подтверждается развитием

гипоксемии, метаболического ацидоза, гиперазотемии, снижением скорости почасового диуреза, повышением содержания васкулоэндотелиального фактора роста в сыворотке крови и структурными изменениями по данным морфологического и морфометрического анализа у лабораторных животных.

2. Установлена патогенетическая взаимосвязь между увеличением концентрации васкулоэндотелиального фактора роста в сыворотке крови, гиперазотемией, снижением темпа диуреза и степенью тяжести и длительностью экспозиции экспериментальной интраабдоминальной гипертензии. При повышении содержания васкулоэндотелиального фактора роста в сыворотке крови отмечаются изменения в почечной паренхиме. При длительной интраабдоминальной гипертензии легкой степени увеличение концентрации васкулоэндотелиального фактора роста в сыворотке крови и морфологические, и морфометрические сдвиги выявляются раньше функциональных изменений почек, таких как снижение скорости почасового диуреза и повышение уровня креатинина.

3. Инициальным звеном повреждения почек у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии является нарушение регионарного кровотока (снижение максимальной систолической скорости кровотока, увеличение индекса резистивности при доплерометрии). Характер изменений показателей газового состава крови, кислотно-основного состояния соответствует степени тяжести интраабдоминальной гипертензии у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии. Установлена отчетливая связь нарастания почечной дисфункции (гиперазотемии, снижении скорости диуреза, проявлений мочевого синдрома) с увеличением уровня интраабдоминальной гипертензии у пациентов исследованных групп.

4. Характер патологических сдвигов содержания биомаркеров повреждения почек (π -глутатион-s-трансфераза), неоангиогенеза (васкулоэндотелиальный фактор роста), воспаления (моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1) в моче отражает интенсивность молекулярно-клеточных изменений в почках у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии и пропорционален уровню повышения интраабдоминального давления. При отсутствии клинических проявлений нефропатии повышенное содержание π -глутатион-s-трансфераза в моче в динамике заболевания после декомпрессии брюшной полости свидетельствует о длительном периоде восстановления молекулярных повреждений канальцев, возникающих на фоне синдрома интраабдоминальной гипертензии. Увеличение уровня моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 как в сыворотке крови, так и в моче подтверждает наличие воспалительного процесса и сопоставимо с тяжестью его клинических проявлений.

5. Сравнительный корреляционный анализ информативности стандартных методов оценки выделительной функции почек и специальных методов исследования (биомаркеров ключевых звеньев повреждения почек) у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии доказывает, что наиболее ранними критериями развития молекулярно-клеточных нарушений в почках являются сдвиги маркера повреждения дистальных канальцев почек (π -глутатион-s-трансфераза) и факторов неангиогенеза (васкулоэндотелиальный фактор роста). Установленные молекулярные маркеры повреждения почек у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии наиболее полно отображают патологические процессы в органе при различных уровнях интраабдоминального давления и могут быть использованы для неинвазивной оценки состояния почечной паренхимы до появления клинических проявлений органной дисфункции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для раннего установления и оценки тяжести почечной дисфункции у новорожденных с СИАГ наряду со стандартным комплексом диагностических исследований целесообразно определять основные биологические маркеры повреждения почечной паренхимы (π -GST и VEGF) в моче в динамике заболевания.

2. Длительное увеличение содержания π -GST в моче у новорожденных с СИАГ после декомпрессии брюшной полости является прогностически неблагоприятным критерием, характерным для значительных молекулярно-клеточных повреждений нефрона. Пациенты с подобными изменениями должны составить группу диспансерного наблюдения в период полного восстановления почечной функции.

3. Для неинвазивной оценки степени гипоксического повреждения нефрона необходимо исследовать содержания VEGF в моче у новорожденных с СИАГ, повышение содержания которого пропорционально степени тяжести и длительности ИАГ, морфологическим и морфометрическим изменениям в почечной паренхиме, что доказано в ходе экспериментальной ИАГ.

4. Для оптимизации ведения новорожденных с СИАГ следует придерживаться предложенного алгоритма ранней диагностики повреждения почек и выбора тактики хирургической коррекции порока у новорожденных с данной патологией, разработанного на основе корреляционного анализа, а также мониторировать динамику уровня ИАД и биомаркеры почечной дисфункции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Биомаркеры повреждения почек у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии / И.А. Будник, **А.А. Цыплаков** // Тезисы XVIII Междунар. медико-биологической конф. молодых исследователей, посвященной двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2015. – С. 90.

2. Молекулярные маркеры повреждения почек у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии / Д.А. Морозов, **О.Л. Морозова, А.А. Цыплаков, Н.Б. Захарова, И.А. Будник** // Педиатрия: журнал имени Г.Н. Сперанского. – 2015. – № 3. – С. 13–19.

3. Biomarkers of kidney injury in newborns with abdominal compartment syndrome / D.A. Morozov, O.L. Morozova, **A.A. Tsyplacov, I.A. Budnik, N.B. Zacharova** // Book of abstracts 16 th European Congress of Pediatric Surgery.– Slovenia, Ljubljana, 2015. – P. 156–157.

4. Маркеры нефропатии у детей с синдромом интраабдоминальной гипертензии / **А.А. Цыплаков** // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2015. – Т. 5, № 4. – С. 292.

5. Роль гипоксии в механизмах повреждения почек при интраабдоминальной гипертензии в эксперименте / **О.Л. Морозова, А.А. Цыплаков, Д.А. Морозов, Н.Б. Захарова** // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – URL: <http://www.science-education.ru/128-22056>

6. Молекулярная диагностика повреждения почек у новорожденных с интраабдоминальной гипертензией / **А.А. Цыплаков, Ю.А. Мельникова** // 17-я Всерос. конф. с междунар. участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях»: сб. тезисов. – М, 2015. – С. 90–91.

7. Гипоксия – ключевое звено повреждения почек при интраабдоминальной гипертензии в эксперименте / Ю.А. Мельникова, **А.А. Цыплаков** // Тезисы VI Междунар. молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015». – С. 275.

8. Повреждение почек у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии / Д.А. Морозов, **О.Л. Морозова, А.А. Цыплаков, Ю.А. Мельникова** // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70, № 6. – С. 704–709.

9. Механизмы повреждения почек при интраабдоминальной гипертензии у новорожденных и в эксперименте / **О.Л. Морозова, А.А. Цыплаков, Д.А. Морозов** // XIX Конгресс педиатров России. Актуальные проблемы педиатрии: сб. науч. тр. – М., 2016. – С. 460.

Список сокращений

ВАД – висцеро-абдоминальная диспропорция
ИАГ – интраабдоминальная гипертензия
ИАД – интраабдоминальное давление
СИАГ – синдром интраабдоминальной гипертензии
ТПС – трахеопищеводный свищ
 π -GST – π -глутатион-s-трансфераза
MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1
VEGF – васкулоэндотелиальный фактор роста

Подписано в печать 11.08.2016. Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times. Печ. л. 1,0
Тираж 100. Заказ № 458-82

Издательство «Техно-Декор»,
Саратов, Московская, 160, тел.:26-38-48,
sar-print.ru