

# КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПОЧКАХ ПРИ ОСТРОЙ МАССИВНОЙ КРОВОПОТЕРЕ (экспериментальное исследование)

А. М. Голубев<sup>1</sup>, Ф. А. Тамаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

<sup>2</sup> Дагестанская государственная медицинская академия, Махачкала

## Correction of Renal Metabolic Disturbances in Acute Profuse Hemorrhage (Experimental Study)

A. M. Golubev, F. A. Tamayeva

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow  
Daghestan State Medical Academy, Makhachkala

**Цель исследования** — сравнительная оценка эффективности различных кровезаменителей в отношении коррекции метаболических нарушений в почках при острой массивной кровопотере. **Материалы и методы.** Опыты поставлены на 120 беспородных крысах-самцах. Острую кровопотерю моделировали удалением в течение 10 мин из организма животных 50% объема циркулирующей крови. Продолжительность экспериментов 1, 4, 7, 14, 30 суток. Проводили гистологические и гистоэнзиматические исследования почек с последующей количественной оценкой интенсивности гистохимических реакций. Результаты морфометрических измерений обрабатывали статистически с применением *t*-критерия Стьюдента. **Результаты.** Острая массивная кровопотеря приводит к развитию дистрофических изменений и угнетению активности окислительно-восстановительных ферментов в клубочковом и тубулярном аппарате почек. Полифункциональная перфторуглеродная эмульсия «Перфторан» обладает выраженным терапевтическим эффектом, который заключается в менее интенсивных проявлениях дистрофических и метаболических изменений в почках, возникающих при острой массивной кровопотере. **Заключение.** Результаты экспериментальных исследований позволяют рекомендовать применение перфторана как более эффективного кровезаменяющего препарата для уменьшения повреждающего влияния гипоксии, развивающейся при острой массивной кровопотере. **Ключевые слова:** острая массивная кровопотеря, почки, перфторан.

**Objective:** to comparatively evaluate the efficacy of various blood substitutes used in the correction of renal metabolic disturbances. **Materials and methods.** Experiments were made on 120 non-inbred male rats. Acute blood loss was simulated, by removing 50% of the volume of circulating blood from the animals for 10 min. The experiments lasted 1, 4, 7, 14, and 30 days. The kidneys were histologically and histoenzymatically studied, followed by the quantitative estimation of the rate of histochemical reactions. Morphometric measurements were statistically processed, by using Student's *t*-test. **Results.** Acute profuse blood loss leads to the development of dystrophic changes and the inhibited activity of redox enzymes in the renal glomerular and tubular apparatuses. The multifunctional perfluorocarbon emulsion Perfluorane has a noticeable therapeutic effect in diminishing the manifestations of renal dystrophic and metabolic changes occurring in acute massive blood loss. **Conclusion.** Experimental results allow the author to recommend perfluorane as a more effective blood-substituting agent to diminish the damaging action of hypoxia developing in acute massive blood loss. **Key words:** acute massive blood loss, kidney, perfluorane.

Кровопотеря является актуальной проблемой медицины. Это объясняется высоким уровнем травматизма, расширением показаний к хирургическим методам лечения (кардиохирургия, трансплантация органов, реконструктивная хирургия и т. д.), при которых возникает массивная кровопотеря, требующая соответствующей коррекции [1]. Несмотря на существенные достижения в решении этого вопроса, выбор кровезаменяющего препарата, его объем и другие вопросы являются предметом дискуссии. Большие надежды были связаны с использованием крови и ее препаратов, полученных от доноров. Однако, как выяснилось, кровь, извлеченная из сосудистого русла, теряет свои нативные

свойства. В этом случае она представляет собой суспензию, состоящую из микросгустков, тромбоцитов и неполноценно функционирующих эритроцитов [2]. Кроме этого, применение крови и ее компонентов сопряжено с риском заражения реципиента опасными инфекционными заболеваниями: вирусными гепатитами, ВИЧ-инфекцией и т. д. Кристаллоидные растворы, крахмалы, альбумин, декстраны, решая отдельные задачи инфузионной терапии, не обладают очень важным механизмом: способностью обеспечивать транспорт газов. Этот пробел в значительной степени восполняется применением отечественного кровезаменителя на основе перфторуглеродов «Перфторан», который обладает

не только газотранспортными свойствами, но и улучшает реологию крови, стабилизирует гемодинамические показатели, модифицирует клеточные мембраны, оказывает иммуномодулирующий эффект и т. д.

В почках при массивной кровопотере отмечаются значительные нарушения кровообращения, в том числе и на уровне микроциркуляторного русла. Особенно уязвим корковый слой почек, так как при снижении артериального давления кровь по дуговым артериям, минуя корковый слой, возвращается в сосуды мозгового слоя. Интенсивность метаболических нарушений и повреждения структур почек связана в значительной степени с продолжительностью гипоксии (или ишемии) и своевременным восстановлением почечного кровотока с использованием инфузионных препаратов.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на 120 белых беспородных крысах в соответствии с правилами работы с лабораторными животными. Были выделены следующие группы экспериментов: 1-я серия — контрольная группа (без кровопотери) — 30; 2-я серия — кровопотеря 50% ОЦК (без возмещения кровезаменителями) — 30; 3-я серия — кровопотеря 50% ОЦК и последующим возмещением физиологическим раствором — 30; 4-я серия — кровопотеря 50% ОЦК с последующим возмещением перфтораном. 50% объема циркулирующей крови удалялось из организма крыс в течение 10 мин. Доза кровезаменителя соответствовала объему кровопотери. Возмещение кровопотери производилось через один час после начала кровотечения. Сроки наблюдения во всех сериях экспериментов составили 1, 4, 7, 14 и 30 суток.

Для гистологического исследования кусочки почек фиксировали в 10% нейтральном формалине, жидкости Карнуа, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, проводили ШИК-реакцию. Липиды в замороженных срезах выявляли окрашиванием суданами III, IV и черным. Для гистоэнзиматических исследований кусочки почек, замороженные в жидком азоте, помещали в криостат и готовили срезы толщиной 10 мкм. Кусочки органов от контрольных и опытных животных при замораживании монтировали в один блок. Это исключает влияние неодинаковой толщины срезов, температурного режима, растворов реактивов и других факторов на результаты гистохимической реакции. Активность щелочной фосфатазы определяли методом азосочетания по Берстону, активность дегидрогеназ (сукцинат дегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, НАД- и НАДФ-диафораз, глюконатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) определяли по Нахласу. Контроль специфичности гистохимических реакций проводился путем выключения из инкубационной среды соответствующего субстрата. Количественная оценка интенсивности гистохимической реакции проводилась с помощью аппаратно-програмного обеспечения «Мекос-Ц1».

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с использованием *t*-критерия Стьюдента.

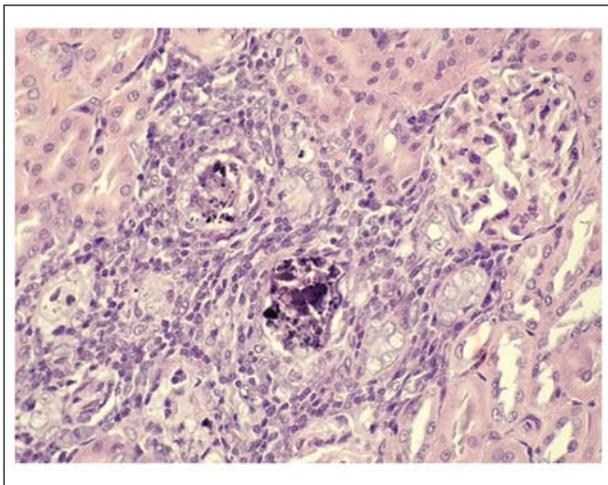
### Результаты и обсуждение

В почках крыс контрольной группы более высокая активность окислительно-восстановительных ферментов отмечается в эпителии проксимальных извитых канальцев и менее интенсивная в эпителии дистальных извитых канальцев, собирательных трубочках. Актив-

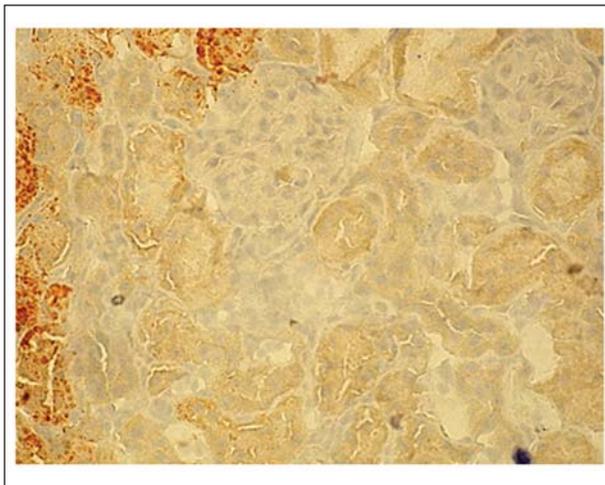
ность НАДФ-диафоразы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эпителии нефронов невысокая. В клетках клубочкового аппарата (эндотелий, мезангиальные клетки) почек активность дегидрогеназ или низкая (сукцинатдегидрогеназа) или умеренная (глюконатдегидрогеназа). Активность щелочной фосфатазы отличалась неравномерностью в различных отделах нефрона. Более высокая активность щелочной фосфатазы регистрировалась в эпителиальных структурах на границе коркового и мозгового слоев почек. В апикальных отделах эпителии проксимальных извитых канальцев почек выявлялся ШИК-позитивный материал (гликокаликс). Липидных включений в эпителиальных клетках нефрона не выявлено.

В опытах с острой массивной кровопотерей без введения кровезаменяющих растворов в почках отмечаются морфологические изменения: в почечных клубочках уменьшается число окрашенных ядер эндотелиальных и мезангиальных клеток. Обнаруживаются апоптотические тельца. Ядра эпителиальных клеток различных отделов нефрона или не окрашены или гиперхромные, с признаками пикноза. Наблюдается сдувание эпителиальных клеток в просвет канальцев. Эти изменения регистрируются в ранние сроки эксперимента и нарастают к 4-м суткам. Через 4–7 суток от начала эксперимента выявляется очаговая пролиферация фибробластов. Отмечается значительное снижение активности сукцинатдегидрогеназы в эпителии почечных канальцев. К 14–30-м суткам активность сукцинатдегидрогеназы возрастает, но не достигает исходного уровня. Активность лактатдегидрогеназы также снижается в эпителии нефронов, но ее активность восстанавливается в более ранние сроки (к 7-м суткам). Угнетается активность и глюконатдегидрогеназы. Восстановление ее активности более быстрыми темпами осуществляется в эпителии дистальных извитых канальцев, петли Генле и более медленно в эпителии проксимальных извитых канальцев. Активность НАД-диафоразы снижается в первые сутки эксперимента, но затем быстро восстанавливается. Процесс восстановления активности НАДФ-диафоразы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы наиболее медленно осуществляется в эпителии петли Генле и собирательных трубочек. Активность щелочной фосфатазы снижается в эпителиальных клетках нефронов в начальных стадиях эксперимента. Восстановление ее активности отмечается через 14 суток, но не достигает к завершению эксперимента исходных значений.

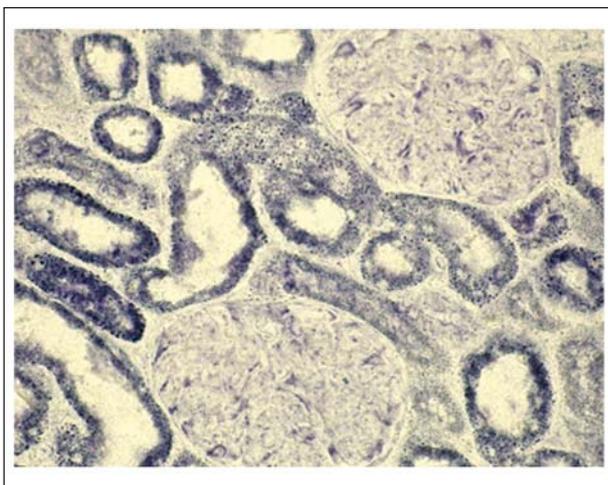
Замещение крови физиологическим раствором сопровождается морфологическими изменениями различных отделов нефрона (1–7-е сутки эксперимента): в некоторых клубочках часть ядер не окрашена, некоторые ядра клеток гиперхромные, другие с пикнотичными, неправильной формы ядрами. Цитоплазма клеток проксимальных извитых канальцев эозинофильная, контуры апикального края эпителиальных клеток нечеткие, ядра обнаруживаются только в части клеток. В просветах канальцев в виде гранул или нитевидных



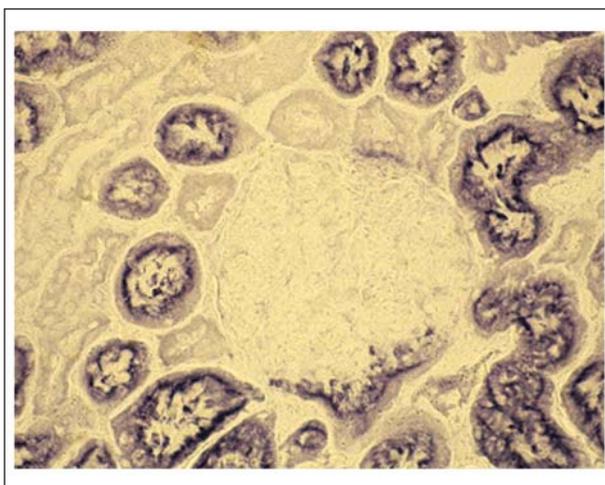
**Рис. 1.** Проплиферация фибробластов и отложение извести в участках некроза эпителия проксимальных извитых канальцев. 1-я серия экспериментов, 14-е сутки. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. 400.



**Рис. 2.** Жировая дистрофия эпителия извитых канальцев. 2-я серия экспериментов, 4-е сутки. Окрашивание суданом IV. Ув. 400.



**Рис. 3.** Снижение активности СДГ-зы в эпителии проксимальных извитых канальцев. 3-я серия экспериментов, первые сутки. Окрашивание по Нахласу. Ув. 400.



**Рис. 4.** Отсутствие активности НАДФ-диафоразы в эпителии петли Генле, дистальных извитых канальцев и умеренная активность в эпителии проксимальных извитых канальцев. 3-я серия экспериментов, 14-е сутки. Окрашивание по Нахласу. Ув. 400.

структур выявляется эозинофильное содержимое. В эпителии извитых канальцев выявляются липидные включения (рис. 2). К 14–30-м суткам данные изменения в значительной степени ликвидируются, но сохраняются участки пролиферации фибробластов и отложение солей кальция на территории некоторых проксимальных извитых канальцев. В первые сутки эксперимента активность сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы преимущественно снижена в эпителии проксимальных извитых канальцев (рис. 3) и эпителии петли Генле, расположенного в мозговом слое почек. Снижение активности глюкокатдегидрогеназы преимущественно отмечается в эпителии нисходящих и восходящих участков петли Генле. Снижение активности НАД-диафоразы наблюдается в эпителии различных отделов нефрона, а НАДФ-диафоразы в эпителии проксимальных извитых канальцев и собирательных тру-

бочек. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижается в эпителии всех отделов петли Генле и собирательных трубочек. Снижение активности дегидрогеназ отмечается и в клетках почечных клубочков.

Интенсивность гистохимической реакции, выявляющей активность щелочной фосфатазы, снижается в различных отделах нефрона. Через 4–7 суток активность окислительно-восстановительных ферментов возрастает, но при проведении гистохимических реакций отмечается неодинаковая интенсивность окрашивания различных эпителиальных клеток, свидетельствующая о неравномерном восстановлении ферментативной активности.

Даже через 14–30 суток эпителиальных структурах нефрона наблюдается низкая интенсивность окрашивания части эпителиальных клеток различных отделов нефрона при выявлении активности окислительно-восстановительных ферментов (рис. 4).

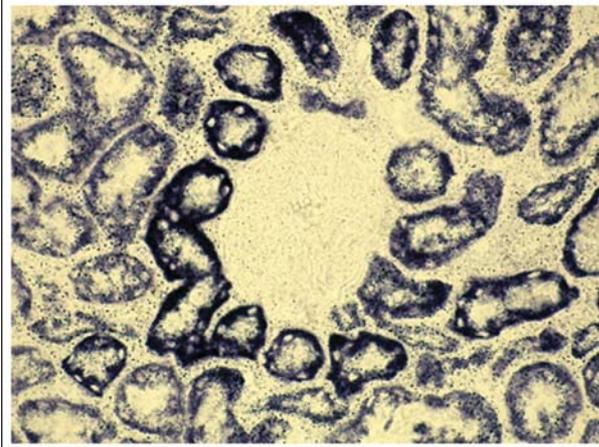


Рис. 5. Высокая активность НАД-диафоразы в эпителии проксимальных извитых канальцев. 4-я серия опытов, 7-е сутки. Окрашивание по Нахласу. Ув. 400.

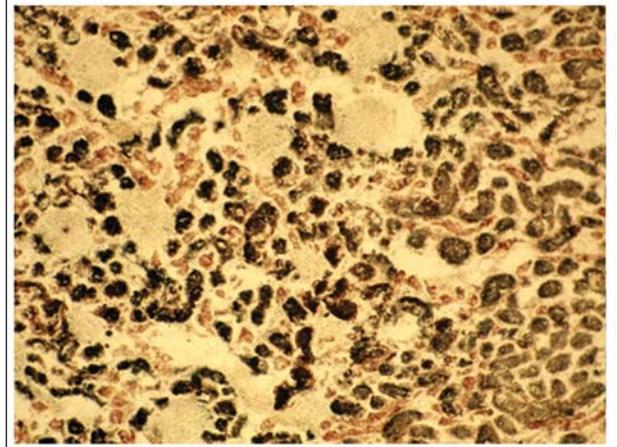


Рис. 6. Высокая активность щелочной фосфатазы в эпителии проксимальных извитых канальцев. 4-я серия экспериментов, 14-е сутки. Окрашивание по Берстону. Ув. 80.

При возмещении кровопотери в первые сутки кровозамещающим препаратом «Перфторан» ядра эпителиальных клеток нефрона, эндотелия капилляров клубочка преимущественно нормохромные. В просветах собирательных трубочек встречаются единичные слущенные клетки. Жировые включения в цитоплазме эпителиальных клеток отсутствуют. В эпителии проксимальных извитых канальцев активность сукцинатдегидрогеназы умеренная или высокая. В эпителии дистальных извитых канальцев преобладает умеренная активность фермента. Эпителий петель Генле окрашен менее интенсивно, а в эпителии собирательных трубочек, расположенных в мозговом слое почек, преобладает интенсивное окрашивание.

Умеренная и высокая активность НАД-диафоразы регистрируется в эпителии различных отделов нефрона. Активность лактатдегидрогеназы неравномерная: в эпителии проксимальных извитых канальцев она значительная, а в эпителии дистальных извитых канальцев и собирательных трубочек умеренная. Менее интенсивное окрашивание отмечается в эпителии петель Генле. Неравномерное окрашивание различных эпителиальных клеток отмечается и при выявлении активности глутаматдегидрогеназы. Умеренная активность НАДФ-диа-

форазы отмечается в эпителии проксимальных извитых канальцев и невысокая активность — в других отделах нефрона. Особенно низкая активность НАДФ-диафоразы регистрируется в эпителии петель Генле и собирательных трубочек, расположенных в мозговом слое почек. Аналогичные результаты гистохимической реакции отмечаются и при выявлении активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Высокая активность щелочной фосфатазы выявляется в эпителии проксимальных извитых канальцев. Эпителий дистальных извитых канальцев и собирательных трубочек характеризуется преимущественно умеренным, а эпителий петель Генле слабым окрашиванием. Усиление интенсивности гистохимической реакции наблюдается (как и в контрольных наблюдениях) на границе коркового и мозгового слоев почек.

Через 4–7 суток от начала эксперимента отмечается снижение активности окислительно-восстановительных ферментов в отдельных эпителиальных клетках, но в большинстве клеток тубулярного эпителия их активность приближается к контрольным показателям (рис. 5). Через 14–30 суток активность исследованных ферментов соответствует исходным значениям (рис. 6).

В таблице приведены показатели оптической плотности, характеризующие темпы восстановления

Показатели оптической плотности, характеризующие уровень активности ферментов в эпителии проксимальных отделов канальцев

Срок опыта	Фермент	Серия опыта	Показатели оптической плотности ( $m \pm \sigma$ )	<i>p</i>
1-е сутки	СДГ-за	Контроль	1,20±0,11	
		№2	0,47±0,02	0,01
		№3	0,60±0,03	0,01
		№4	0,85±0,20	0,02
4-е сутки	ЛДГ-за	Контроль	1,50±0,05	
		№2	0,76±0,05	0,01
		№3	0,81±0,06	0,01
		№4	1,30±0,06	0,05
7-е сутки	ГДГ-за	Контроль	1,78±0,09	
		№2	1,23±0,09	0,01
		№3	0,96±0,10	0,01
		№4	1,87±0,03	0,03

активности окислительно-восстановительных ферментов при использовании различных кровозаменяющих растворов.

Проведенные экспериментальные исследования свидетельствуют о выраженных морфологических и энзимогистохимических изменениях в клубочковом и тубулярном аппарате почек при острой, массивной (50% ОЦК) кровопотере.

Два главных фактора определяют неблагоприятные эффекты острой кровопотери: снижение внутрисудистого объема крови (ОЦК) и уменьшение содержания кислородоносителя — гемоглобина. Следствием этого является нарушение всех механизмов транспорта кислорода и развитие гипоксии смешанного типа. Острая кровопотеря сопровождается циркуляторными расстройствами [3]. Патогенез острой кровопотери неодинаков при различных ее объемах. Невосполненная острая кровопотеря в объеме 40% ОЦК представляет угрозу для жизни и неспособна к самостоятельной компенсации. Развиваются тяжелые нарушения центральной гемодинамики, микроциркуляции, транспорта кислорода, метаболизма, гипергидратация интерстиция. Патогенез тяжелой кровопотери, равной 50% ОЦК, обусловлен тяжелыми нарушениями обмена веществ в организме [4]. Массивная кровопотеря ограничивает доставку кислорода к клеткам различных органов, где он участвует в реакциях аэробного образования энергии, являясь субстратом терминального фермента митохондриальной дыхательной цепи — цитохромоксидазы. В 1959 году было обнаружено явление, получившее название «гипоксический парадокс». Его смысл заключается в нарушении энергетического обмена до достижения критической концентрации кислорода и задолго до снижения активности цитохромоксидазы. Установлено, что снижение содержания кислорода ведет к изменению активности митохондриальных ферментов (митохондриальный ферментативный комплекс), относящихся к НАД-зависимому пути окисления. Угнетение НАД-оксидазного пути окисления и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования отражает первую компенсаторную стадию биоэнергетической гипоксии. Затем нарушения электронтранспортной функции дыхательного пути распространяются на область цитохромов b-c и развивается вторая (обратимая) стадия биоэнергетической гипоксии. Угнетение активности цитохромоксидазы характеризует третью (необрати-

мую) стадию, сопровождающейся декомпенсацией энергетического обмена [5].

В связи с этим, ликвидация расстройств микроциркуляции и восстановление доставки кислорода к органам и тканям при острой массивной кровопотере является необходимым условием коррекции метаболических нарушений. Этим условиям отвечает отечественный препарат «Перфторан», созданный на основе перфторуглеродов. Обеспечение перфтораном транспорта кислорода обусловлено его собственной кислородной емкостью и изменением реологических свойств крови [6]. Этому способствуют снижение вязкости крови, небольшие размеры частиц перфторуглеродов, их большая суммарная поверхность, модификация мембран эритроцитов, взаимодействие частиц перфторуглеродов в кровотоке с эритроцитами. Многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о протекторных свойствах перфторана при острой массивной кровопотере [7].

## Заключение

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования свидетельствуют о выраженных морфологических изменениях в клубочковом и тубулярном аппарате почек, возникающих при острой массивной кровопотере. Восполнение кровопотери физиологическим раствором не позволяет в полной мере обеспечить восстановление кровотока и доставку кислорода, что документируется развитием дистрофических и некротических изменений изучаемых структур, угнетением активности окислительно-восстановительных ферментов, формированием соединительной ткани в участках повреждения на поздних этапах эксперимента. Полифункциональный кровезаменитель «Перфторан» оказывает выраженный терапевтический эффект, подтверждаемый гистологическими и энзимогистохимическими исследованиями. Менее выражены дистрофические изменения тубулярного и клубочкового аппарата почек, менее интенсивно снижение активности окислительно-восстановительных ферментов и восстановление их активности осуществляется в более короткие сроки.

Результаты экспериментальных исследований позволяют рекомендовать применение перфторана в целях предупреждения развития циркуляторных и метаболических нарушений в почках при острой массивной кровопотере.

## Литература

1. Мороз В. В., Остапенко Д. А., Мещеряков Г. Н., Радаев С. М. Острая кровопотеря. Взгляд на проблему. *Анестезиология и реаниматология* 2002; 6: 4–9.
2. Воробьев А. И. Острая массивная кровопотеря. В кн.: Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии. Пушино; 2003. 9–13.
3. Кожура В. Л., Новодержкина И. С., Кирсанова А. К. Острая массивная кровопотеря: механизмы компенсации и повреждения. *Анестезиология и реаниматология* 2002; 6: 9–13.
4. Ярочкин В. С., Панов В. П., Максимов П. И. Острая кровопотеря. М. Медицинское информационное агентство; 2004.
5. Лукьянова Л. Д. Роль биоэнергетических нарушений в патогенезе гипоксии. *Патол. физиология и эксперим. терапия* 2004; 2: 2–11.
6. Иванецкий Г. Р. Биофизические основы создания перфторуглеродных сред и газотранспортных кровезаменителей (обзор). В кн.: Перфторорганические соединения в биологии и медицине. Пушино; 2001. 4–48.
7. Голубев А. М., Белоярцев Ф. Ф., Васильев А. Э., Покровский Ю. Э. Реакции биологических систем при замещении крови эмульсиями фторуглеродов. М.: Теис; 1993.

Поступила 22.06.07