

АНАЛИЗ НЕФРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ АНТИГИПОКСАНТА ВОЛЮМОКОРРЕКТОРА ФУМАРАТА ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ СИНДРОМЕ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

С.В. Попов^{1,2}, Р.Г. Гусейнов^{1,3}, К.В. Сивак¹, О.Н. Скрябин¹,
В.В. Перепелица¹, Н.С. Буненков¹, Е.А. Малышев¹, Т.А. Лелявина¹

¹СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ

³Санкт-Петербургский государственный университет
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Резюме. Открытая или лапароскопическая резекция почки при хирургическом лечении локализованной формы почечноклеточного рака часто сопряжена с введением почки в условия тепловой ишемии. Применение ТИП позволяет предотвратить развитие паренхиматозного кровотечения, оптимизировать условия оперирования, существенно повысить эффективность гемостаза. Однако вероятность ишемически-гипоксического повреждения сохраняемой части почечной ткани и нарушения почечной функции в послеоперационном периоде являются важными проблемами тепловой ишемии почки.

Цель исследования: оценка результатов применения фумарата натрия, фуросемида и маннитола на начало и исход тепловой ишемии почек на экспериментальной модели 30- или 60-минутной тепловой ишемии почки у кроликов.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование выполнено на 360 конвенциональных кроликах-самцах породы «Шиншилла» массой тела $2,6 \pm 0,3$ кг, которые были разделены на 10 групп. Контрольная группа №1 состояла из интактных животных, в контрольную группу №2 входили кролики, которых оперировали без пережатия почечной артерии. Животным из рабочих групп (№3-№10) создавали экспериментальную модель 30- или 60-минутной ТИП. В группах №3 и №4 медикаментозное сопровождение не предусматривалось. Остальные кролики тепловое обескровливание почки переносили на фоне действия фумарата натрия (группы №5 и №6 - 1,5 мл/кг в/в), лазикса (группы №7 и №8 - 3,0 мг/кг в/в) и маннитола (№9 и №10 - 1,0 г/кг в/в). Изучалось влияние ТИП на ультраструктуру почечной ткани и уровни содержания в крови и в моче NGAL, цистатина-С и креатинина.

Результаты. После экспериментальной некорригированной 30-минутной ТИП у подопытных животных выявляются набухание и отек конечной части микроворсин эпителия проксимальных канальцев, увеличение в гиалоплазме эпителиоцитов численности лизосом, появление в просветах дистальных канальцев и собирательных трубочек хлопьевидного содержимого средней электронной плотности, а также резкое (пикообразное) повышение содержания в крови и в моче NGAL и цистатина-С. Увеличение продолжительности обескровливания до 60 минут сопровождается возрастанием степени тяжести и масштабов отмеченных нарушений. В группах, где применялись фумарат натрия, лазикс и маннитол, отмеченные ультраструктурные нарушения были выражены в меньшей степени, однако лучшую нефропротективную активность проявлял фумарат натрия. На фоне действия маннитола выраженность отмеченных расстройств была меньшей, чем в группе, где применение маннитола, лазикса или фумарата натрия не предусматривалось. Лазикс и натриевая соль фумаровой кислоты проявляли более высокую нефропротекторную активность. Наилучшие результаты были получены у животных, защищенных фумаратом натрия.

Выводы. Фумарат натрия оказал наибольшее нефропротекторное действие в отношении ишемии почки у кроликов, затем фуросемид, в то время как маннитол – наименьшее. Применение фумарата натрия позволяет максимально эффективно защищать и стимулировать почечную ткань во время тепловой ишемии почки.

Ключевые слова: тепловая ишемия почки, резекция почки, ишемически-гипоксическое повреждение, фармакологическая нефропротекция, антигипоксанта, фумарат натрия.

COMPARATIVE STUDY OF NEPHROPROTECTIVE ACTIVITY OF SODIUM FUMARATE, MANNITOL AND FUROSEMIDE ON AN EXPERIMENTAL MODEL OF THERMAL RENAL ISCHEMIA

S.V. Popov^{1,2}, R.G. Huseynov^{1,3}, K.V. Sivak¹, O.N. Scriabin¹,
V.V. Perepelitsa¹, N.S. Buchenkov¹, E.A. Malyshev¹, T.A. Lelyavina¹

¹St. Petersburg State Medical University Clinical Hospital of St. Luke

²FGBVOU VO "Military Medical Academy named after S.M. Kirov"

of the Ministry of Defense of the Russian Federation

³St. Petersburg State University

St. Petersburg, Russian Federation

Summary. While performing surgical treatment of the localized form of renal cell cancer by means of open or laparoscopic kidney resection, renal warm ischemia (RWI) is becoming the necessary aspect of the intervention. Using RWI allows to prevent parenchymal bleeding, to optimize operative conditions, to increase significantly the efficiency of hemostasis. However, an important problem is the probability of ischemic hypoxic damage of the secured part of the kidney tissue during RWI and renal functional impairment in the postoperative period.

Aim of the study – comparative study of nephroprotective activity of sodium fumarate, mannitol and furosemide using experimental model of 30- and 60-minute renal warm ischemia in rabbits.

Materials and methods. The experiments were carried out on 360 conventional male-rabbits of the "Chinchilla" breed weighed $2,6 \pm 0,3$ kg which were allocated into 10 groups. The control group №1 included intact animals, the control group №2 included the rabbits that were operated without clamping the renal artery. For the animals from the trial groups (№3-№10) the experimental model of 30- and 60-minute RWI was developed. In groups №3 and №4 medication was not provided. Other rabbits endured renal warm exsanguination against the background of sodium fumarate (groups №5 and №6 - 1,5 ml/kg IV), lasix (groups №7 and №8 - 3,0 mg/kg IV) and mannitol (№9 and №10 - 1,0 g/kg IV). The influence of RWI on the renal tissue ultrastructure and the levels of NGAL, Cystatin-C and creatinine in blood and urine were studied.

Results. Experimental pharmacologically non-corrected 30-minute RWI in trial animals induced swelling and edema of the final part of microvilli of the proximal tubules epithelium, increase of lysosome number in the hyaloplasm of epithelial cells, appearance of flaky content of medium electronic density in the lumens of distal tubules and collecting tubes, as well as sharp peak-like increase of NGAL and cystatin-C in blood and urine. Increasing the time of exsanguination up to 60 minutes was accompanied by the growth of severity and range of the observed disorder. In groups where sodium fumarate, lasix and mannitol were used the observed ultrastructural disturbances were expressed to lesser extent, whereas sodium fumarate demonstrated the best nephroprotective activity. In case of using mannitol the intensity of the observed disturbances was less than in the groups where mannitol, lasix or sodium fumarate were not provided. Lasix and sodium salt of fumaric acid showed a higher nephroprotective activity. The best results were received in the animals protected by sodium fumarate.

Conclusions. The studied medications provided a nephroprotective effect regarding renal ischemia of rabbits, sodium fumarate in the greatest degree, furosemide – less and mannitol – the least. Use of sodium fumarate allows to protect and stimulate the kidney tissue maximum effectively during oxygen deprivation of the ischemized organ.

Key words: renal warm ischemia, kidney resection, ischemic hypoxic damage, pharmacological nephroprotection, antihypoxants, sodium fumarate.

Введение. Тепловая ишемия почки (ТИП) подразумевает временную приостановку кровенаполнения почки посредством интраоперационного пережатия почечной артерии во время открытой или лапароскопической резекции данного органа. Временное интраоперационное обескровливание почки — метод выбора при хирургическом лечении локализованной формы почечно-клеточного рака (ПКР) [1,2].

Необходимость в операциях такого рода увеличивается год от года. По данным Российского Центра информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии в составе МНИОИ им. П.А. Герцена, в 2011–2014 гг. встречаемость ПКР среди взрослого населения Российской Федерации повышалась в среднем за один год на 1,2 %; с 2014 по 2016 г. ежегодный прирост составил уже 1,7 %; а с 2016 по 2017 г. — 2,6 %. Распространенность ПКР за период с 2011 г. по 2017 г. увеличилась с 78,5 случая на 100 000 человек до 114,7 случая на 100 000 населения. При этом частота ПКР в стадиях T1 и T2 за тот же промежуток времени выросла с 54,2 % до 63,9 % [3].

Применение ТИП при таких вмешательствах, безусловно, является одним из факторов их успешности, так как позволяет предотвратить развитие паренхиматозного кровотечения, оптимизирует условия оперирования, существенно повышает эффективность гемостаза [4]. Однако ТИП при этом остается ишемией — типовым патологическим процессом с комплексом патологических и защитно-приспособительных реакций, проявляющихся морфологическими, метаболическими и функциональными нарушениями со стороны ишемизированной (почечной) ткани.

Существует три элемента патогенеза структурно-функциональной дезорганизации ренальной ткани при хирургическом удалении пораженного раком участка почки: сосудистый, обструктивный и реперфузионный. Причиной активации двух первых из них является пережатие почечной артерии, последнего — снятие ограничений для поступления артериальной крови во внутривисцеральное русло [5,6].

При пережатии почечной артерии в условиях прекращения поступления крови в микрососудистую сеть ренальной паренхимы первичным специфическим фактором, поражающим клетки почки, является гипоксия. Непосредственным ее последствием становится торможение АТФ-синтетической функции митохондрий и формирование недостатка АТФ в эффекторных нефроцитах. Доказано, что в условиях кислородной депривации максимально уязвимыми являются эпителиоциты сегмента S-3 проксимальных канальцев, обладающие наибольшей гликолитической активностью. По мере реализации механизмов гипоксического повреждения формируются или усиливаются нарушения функций нефронов [7-13].

Чаще всего по времени выделяют ТИП, продолжающуюся до 10 мин, от 10 до 30 мин и более 30 мин. По мнению многих исследователей, в первом случае функциональные расстройства почечной ткани не возникают, во втором — наблюдаются обратимые нарушения структуры и функции. Ограничение кровотока более 30 мин характеризуется высокой вероятностью летального повреждения эффекторных нефроцитов. В целом принято считать, что ишемическое воздействие «безопасно», если оно длится не больше 25 мин [14].

В то же время есть сторонники более жесткой позиции по отношению к проблеме допустимой продолжительности тепловой ишемии. Так, например A.R. Patel и соавт. (2011), R.H. Thompson и соавт. (2010; 2012) подчеркивают, что на отдаленные функциональные результаты резекции почки оказывает влияние каждая минута остановки кровоснабжения оперируемой почки [15-17]. Следует отметить, что ткань почки не вся и не синхронно участвует в мочеобразовании, поэтому указанный выше авторами довод является весьма спорным.

Сейчас механизмы гипоксической альтерации клеток изучены весьма подробно. Установлена тождественность их причинно-следственных цепочек для клеток различного вида и происхождения. Показана зависимость появления новых расстройств внутриклеточного гомеостаза от времени

гипоксии. Так, например, экспериментально доказано, что в пределах первых 5 мин кислородной депривации наблюдается снижение в 2–4 раза уровня внутриклеточного АТФ. В течение последующих 10 мин в цитоплазме и митохондриях накапливаются ионы кальция, выступающие в роли активаторов мембранных фосфолипаз. Далее, от 15-й до 30-й минуты гипоксии, начинается ассоциированный с деятельностью активных мембранных фосфолипаз распад фосфолипидов мембран митохондрий с повышением их проницаемости, торможением процессов аккумуляции ионов кальция, а также разобщением окислительного фосфорилирования и снижением показателей работы митохондрий — коэффициентов окислительного фосфорилирования и дыхательного контроля до 0 и 1 соответственно. В течение последующего получаса возможно транзитное повышение интенсивности дыхания митохондрий. Затем, через 60–90 мин от начала гипоксического воздействия, повреждения митохондрий приобретают необратимый характер, что влечет за собой гибель клетки в целом [18–21].

Такой сценарий развития гипоксической альтерации на молекулярно-клеточном уровне — стандартный для всех клеток независимо от их тканевой и органной принадлежности — в целом полностью согласуется с выводами многих исследователей о том, что, во-первых, продолжительность тепловой ишемии является ведущим фактором, усиливающим или уменьшающим губительное влияние кислородной депривации и способным предопределить послеоперационный уровень функциональной состоятельности мочеобразовательной системы [22]; во-вторых, даже в случаях, когда продолжительность ТИП не превышает 25 мин, послеоперационное снижение почечной функции имеет место более чем у 20% пациентов [23].

В данный момент высока актуальность научного поиска методов защиты ренальной ткани при выполнении операций, фрагментом которых является ТИП. Выделяют два направления. Первое из них ориентировано на

уменьшение продолжительности ТИП и/или ее выраженности (методики «нулевой ишемии»; селективной паренхиматозной ишемии; суперселективной деваскуляризации опухоли; суперселективной эмболизации артерий, питающих опухоль; управляемой гипотонии; «холодовой ишемии» с перфузией охлажденных растворов через сосудистое русло почки или обкладывании ее льдом и др.) [24–25], второе — связано с фармакологической поддержкой ренальной паренхимы во время тепловой ишемии почки. Обращает на себя внимание малочисленность и разрозненность публикаций, посвященных проблемам антигипоксической защиты почечной ткани, в том числе вопросам антигипоксической нефропротекции в условиях ТИП. Отмеченные обстоятельства послужили основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования: сравнительное изучение нефропротекторной активности маннитола, фуларата натрия и фуросемида на экспериментальной модели 30- или 60-минутной ТИП.

Материал и методы. Исследования были проведены на 360 конвенциональных кроликах-самцах породы «Шиншилла» со средней массой тела $2,6 \pm 0,3$ кг. В работе с животными придерживались этических принципов, изложенных в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях».

Для достижения цели исследования разработан способ моделирования интраоперационной тепловой ишемии ренальной ткани, который заключается в наложении микрососудистого зажима на почечную артерию после срединной лапаротомии и скелетирования почечной ножки. Пережатие сосуда длилось 30 или 60 мин. После взятия образцов паренхимы почки кровотоки по почечной артерии восстанавливались.

Хирургическое вмешательство завершали контролем гемостаза и ушиванием раны передней брюшной стенки отдельными узловыми викриловыми швами. Во время операции животным обеспечивали анестезиологическое пособие (золетил 25 мг/кг в/в; рометар 2% 1,0–1,5 мл в/м; галотан-

кислородная смесь). Для профилактики микробного заражения интраоперационно внутримышечно вводили раствор бициллина-5 в дозе 1 500 000 ЕД/кг.

Сначала всех животных разделили на 10 групп (2 контрольные и 8 рабочих), в каждой из которых число животных равнялось 36. Контрольные группы №1 и №2 включали интактных кроликов (№1) и кроликов, которым проводили «ложную» операцию без пережатия почечной артерии (№2). Во всех рабочих группах при выполнении вмешательства у каждого из подопытных животных создавали модель тепловой ишемии почки, продолжительность которой в группах №3, №5, №7 и №9 составляла 30 мин, в группах №4, №6, №8 и №10 — 60 мин.

В группах №3 и №4 вмешательство выполняли без применения средств фармакологической нефропротекции. Кроликам из групп №4 и №5 за 24 и 2 ч до операции вводили внутривенно натриевую соль фумаровой кислоты (далее — фумарат натрия) в разовой дозе 1,5 мл/кг. В качестве препаратов сравнения использовали лазикс (группы №7 и №8) и маннитол (группы №9 и №10). Введение обоих препаратов осуществляли внутривенно за 10 мин до наложения микрососудистого зажима на почечную артерию: лазикса — в дозе 3 мг/кг, маннитола — в дозе 1 г/кг.

У всех подопытных животных изучали макро- и ультраструктурные особенности почечной ткани. Для оценки макроструктурных характеристик почки проводили визуальную оценку органа. Состояние ультраструктурных компонентов ренальной ткани анализировали методом трансмиссионной электронной микроскопии биоптатов почечной паренхимы в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России на просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM 1011 с разрешающей способностью по точкам 0,3 нм, по линиям 0,14 нм и возможностью увеличения

рассматриваемых объектов в 100–1 000 000 раз. Контрастирование проводили в спиртовом растворе уранил-ацетата и водном растворе цитрата свинца. Цифровую электронную микрофотосъемку осуществляли с помощью камеры Morada.

У всех кроликов через 2, 12, 24 и 72 ч после экспериментального вмешательства, а также в конце 1, 2, 3, и 4-й недели послеоперационного периода в сыворотке крови и/или в моче измеряли уровни NGAL, цистатина-С, L-FABP, KIM-I, а также креатинина.

Для обработки полученных данных применяли методы вариационной статистики, пакет прикладных программ STATISTICA 6, содержащихся в Microsoft Excel 2010. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. У всех подопытных животных, перенесших ТИП, продольный и поперечный размеры почки уменьшались примерно на 5 % по сравнению с таковыми у кроликов контрольной группы №2. Отмечалось снижение тургора, побледнение и похолодание поверхности почки.

По результатам электронной микроскопии, после 30-минутной ТИП и 60-минутной реперфузии в проксимальных канальцах отмечались увеличенное число лизосом и вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов, грушевидность конечных сегментов микроворсин, признаки слабого набухания и отека щеточной каймы (рис. 1). В просветах дистальных канальцев и собирательных трубочек определялось хлопьевидное содержимое. У животных, не получавших медикаментозной поддержки, данные явления встречались в подавляющем большинстве случаев. В группах, где применялись фумарат натрия, лазикс и маннитол, отмеченные ультраструктурные нарушения были выражены в меньшей степени. Лучшую нефропротекторную активность проявлял фумарат натрия.

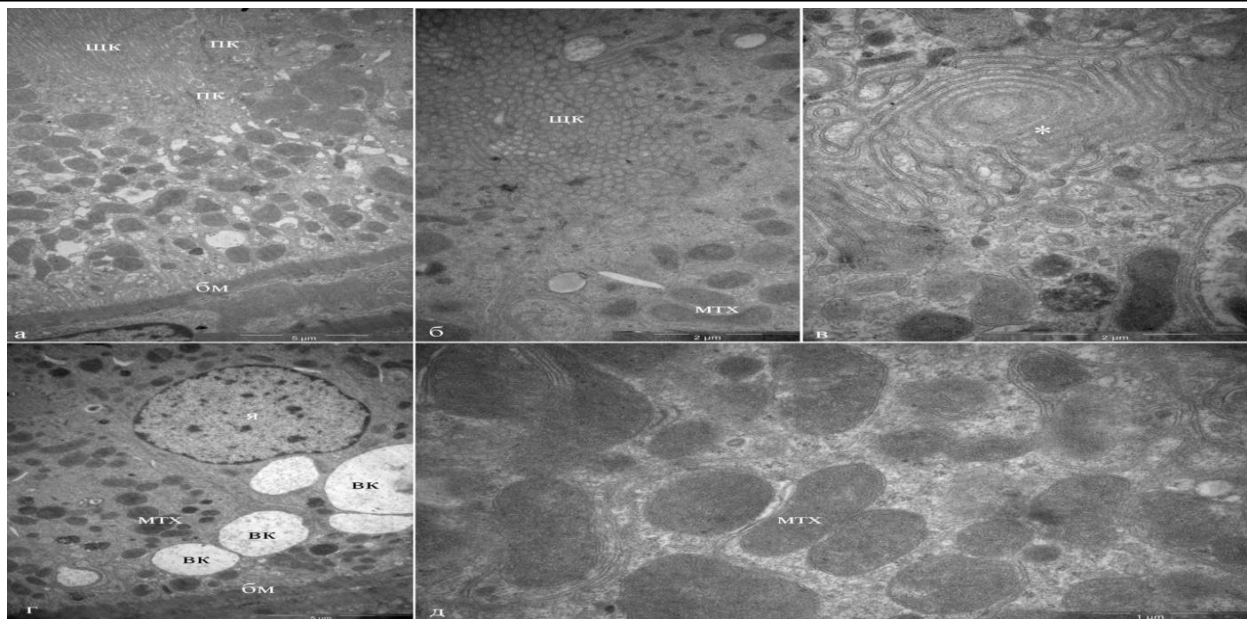


Рис. 1. Ультратонкий срез почечной ткани после 30-минутной тепловой ишемии и 60-минутной реперфузии почки.

А — общий вид эпителия проксимального канальца, $\times 200\ 000$; Б — набухание щеточной каймы, $\times 500\ 000$; В — слияние мембран микроворсинок щеточной каймы и формирование лабиринтообразной мембранной структуры (звездочка), $\times 500\ 000$; Г — вакуоли в цитоплазме клеток проксимального канальца, $\times 200\ 000$; Д — митохондрии клеток проксимального канальца сохраняют нормальную структурную организацию.

ЦК — щеточная кайма, БМ — базальная мембрана, МТХ — митохондрии, ВК — вакуоли, Я — ядро.

Все выявленные изменения ультраструктуры ишемизированной в течение 30 мин ренальной ткани имели место и после 60-минутной ТИП, но степень их выраженности была заметно выше (рис. 2). Кроме того, появились новые расстройства, отсутствовавшие после окклюзии почечной артерии меньшей продолжительности: агрегация и агглютинация форменных элементов в клубочковых и околоканальцевых капиллярах; изменения формы микроворсин проксимальных канальцев с заменой пальцевидной конфигурации на грушевидную или пузырьковидную; деструкция цитоскелета эпителиоцитов проксимальных канальцев в виде деполимеризации и фрагментации

микротрубочек и миофиламентов; скопления рыхлой хлопьевидной субстанции с вкраплениями зернистого детрита не только в дистальных, но и в проксимальных канальцах; набухание и вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов дистальных канальцев и собирательных трубочек с утолщением их стенок и уменьшением диаметра просвета. После 60-минутной тепловой ишемии ренальной паренхимы без фармакокоррекции отмеченные ультраструктурные признаки гипоксической альтерации почечной ткани были выражены максимально. Применение лазикса и маннитола позволило несколько уменьшить степень расстройств

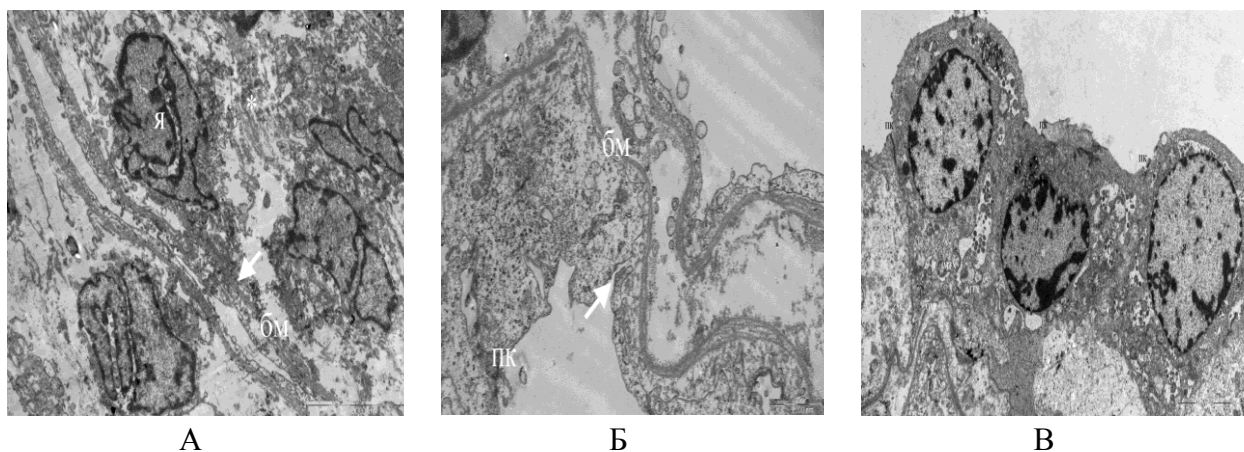


Рис. 2. Ультратонкий срез почечной ткани после 60-минутной ишемии и 60-минутной реперфузии.

А — проксимальный каналец: массовая гибель эпителиоцитов с фрагментацией их цитоплазмы (звёздочка) и обнажением участков базальной мембраны (стрелка), $\times 100\ 000$; Б — тонкий отдел петли Генле: частичное обводнение цитоплазмы эпителиоцитов и нарушение целостности отдельных плотных контактов (стрелка). При этом большинство плотных контактов сохраняют нормальную организацию, $\times 20000$; В — дистальный каналец: фрагментация митохондрий на небольшие округлые структуры с частичной утратой крист, $\times 20000$.

Я — ядра эпителиальных клеток, БМ — базальная мембрана, ПК — плотные контакты

Применение фумарата натрия сократило встречаемость таких нарушений до единичных случаев. После 30-минутной ТИП и введения этого препарата изменения ультраструктуры почки ограничивались редкими грушевидными расширениями концов микроворсин и немногочисленными скоплениями рыхлого хлопьевидного вещества в просветах дистальных канальцев и собирательных трубочек.

Как показано на рис. 3, после 60-минутного теплового обескровливания, выполненного на фоне действия фумарата натрия, в проксимальном отделе почечных канальцев для большинства эпителиоцитов характерно сохранение щеточной каймы в интактном виде (или, возможно, очень быстрая регенерация щеточной каймы); грушевидные и пузырьковидные расширения микроворсинок встречались в единичных случаях. В клетках эпителия проксимальных канальцев хорошо определялись базальные

складки, ассоциированные с ориентированными по апикально-базальной оси многочисленными митохондриями, контакт клеток с базальной мембраной, практически полная сохранность системы изолирующих плотных контактов, определяющих целостность эпителиального пласта и его функциональную поляризацию. Лишь в отдельных случаях наблюдались повышение числа лизосом, фрагментация микротрубочек и миофиламентов цитоскелета в цитоплазме клеток эпителия проксимальных канальцев. Все эти признаки приближают ультраструктурную организацию проксимального канальца в условиях фумарат-опосредованной нефропротекции к нормальной и резко отличают ее от картины практически полной деструкции проксимального канальцевого эпителия после 60-минутной ТИП, выполненной без медикаментозной поддержки.

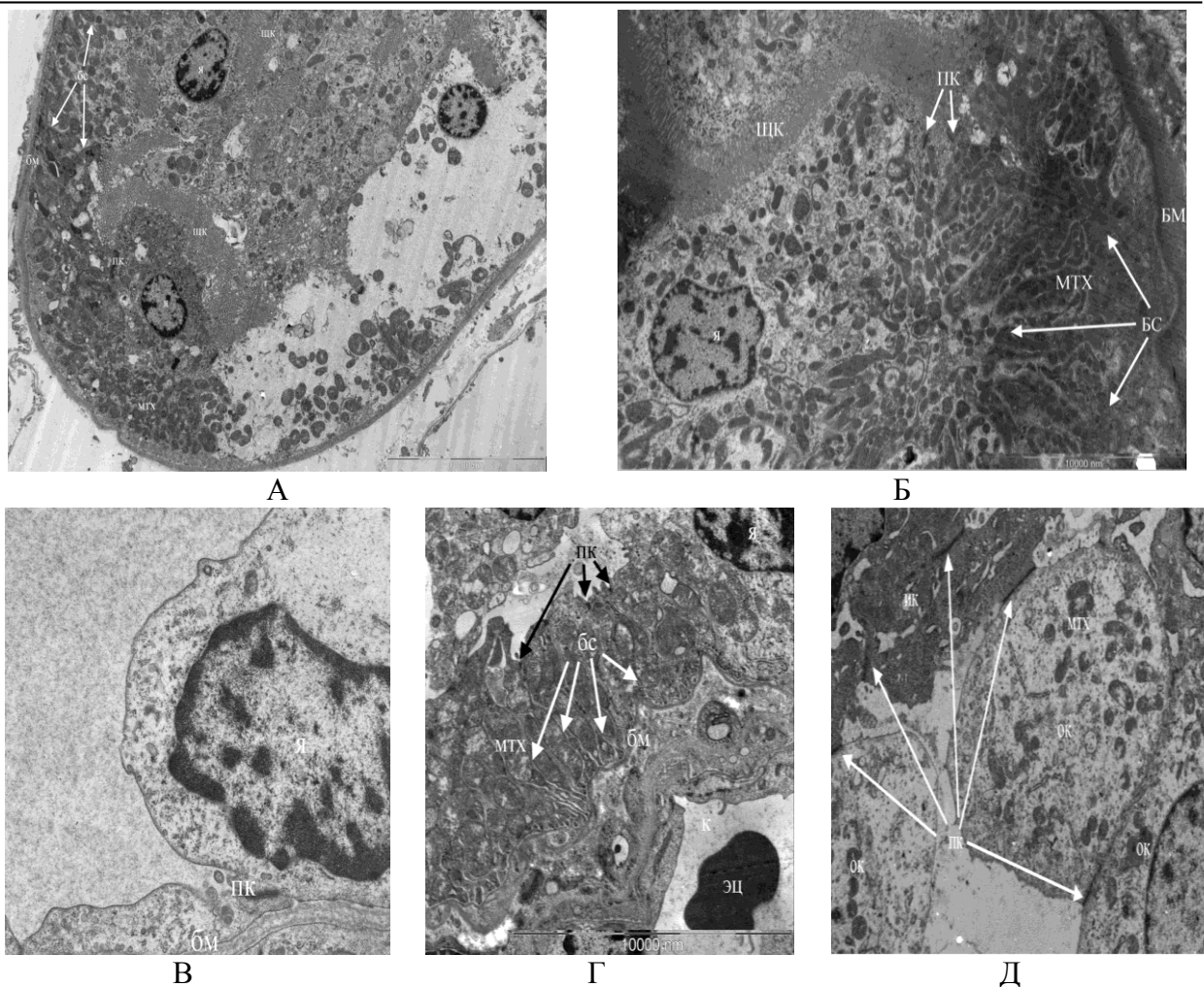


Рис. 3. Ультратонкий срез почечной ткани после 60-минутной ТИП и 60-минутной реперфузии на фоне действия 15 % водного раствора фумарата натрия. $\times 20\,000$.

А, Б — проксимальный каналец, А (внизу справа) — некротическая гибель части эпителиоцитов при сохранении нормальной ультраструктуры остальных клеток в составе эпителиального слоя; В — тонкий отдел петли Генле, Г — дистальный каналец, Д — собирательная трубка.

ЩК — щеточная кайма, Я — ядро эпителиоцита, МТХ — митохондрии, БС — базальные складки, БМ — базальная мембрана, ПК — плотные контакты, ЭЦ — эритроциты, ОК — основные клетки собирательной трубки, ИК — интеркалярные клетки собирательной трубки.

Несмотря на значительное снижение выраженности патоморфологических изменений в проксимальном канальце при использовании фумарата натрия, в некоторых случаях прослеживалась клеточная гибель канальцевых эпителиоцитов (рис. 3, А). Однако имел место исключительно некроз отдельных немногочисленных клеток, соседствующих с нормальными эпителиоцитами в том же канальце. У животных, перенесших 60-минутное тепловое обескровливание почки и не получавших фумарат натрия, имела место картина массовой гибели эпителиоцитов.

Ультраструктура более дистальных сегментов нефрона (тонкий сегмент петли

Генле, дистальный каналец, собирательная трубка) в условиях фумарат-опосредованной фармакологической нефропротекции при 60-минутной ТИП была сходна с таковой в контрольных условиях (рис. 3, В–Д). Отмечалась лучшая сохранность митохондрий дистального канальца, ассоциированных с базальными складками клеточной мембраны, по сравнению с их фрагментацией и деградацией крист после 60-минутного теплового обескровливания почки у животных, не получавших фумарат натрия, при ишемическом стрессе без нефропротекции (см. рис. 3, Г).

Динамика концентраций NGAL и цистатина-С в сыворотке крови и в моче,

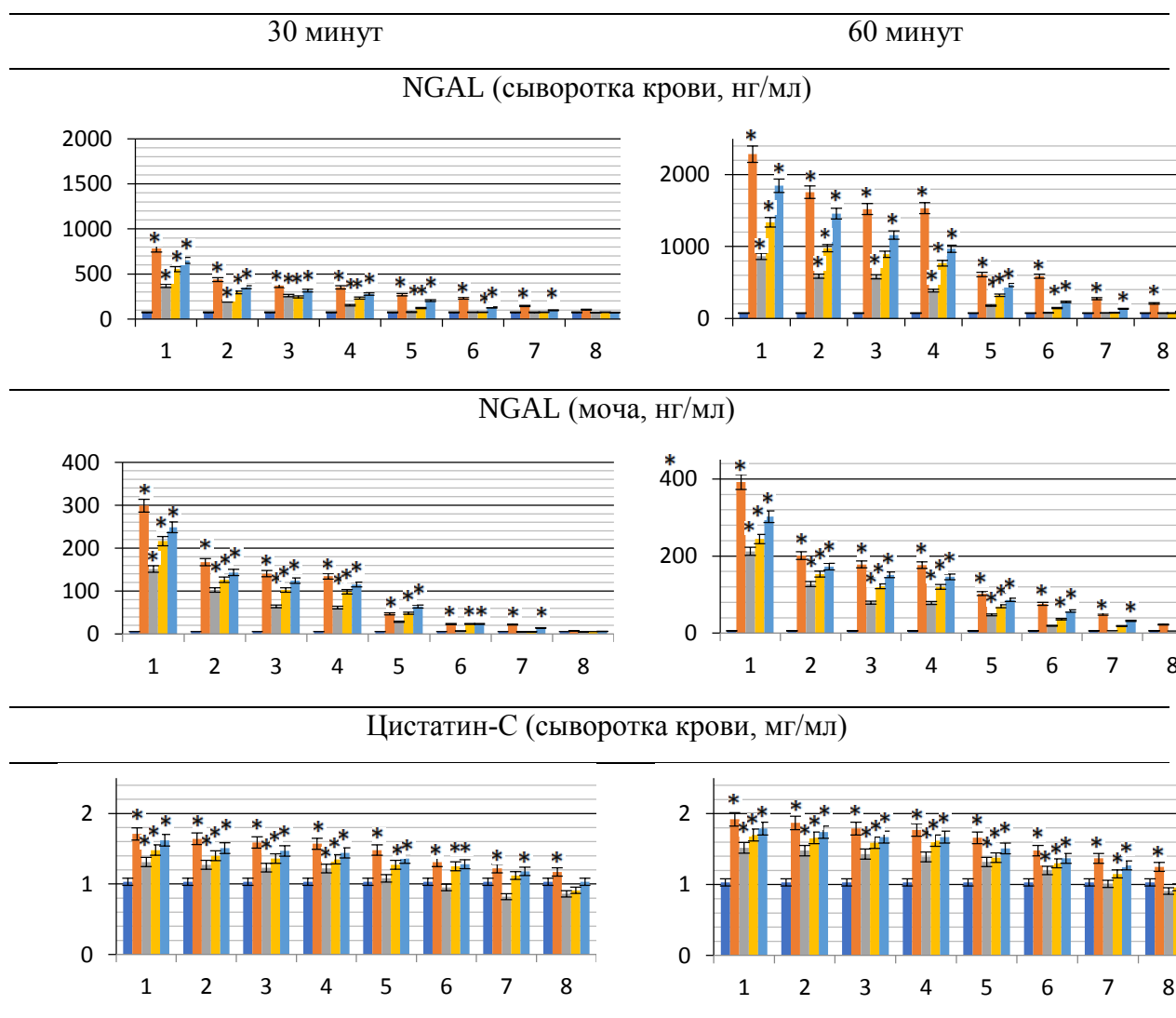
уровня креатинина в сыворотке крови после 30- или 60-минутной ТИП (некорригированной и выполненной на фоне действия фумарата натрия, лазикса и маннитола) отражены на рис. 4.

Сывороточная концентрация NGAL уже через 2 ч после экспериментальной операции с 30- или 60-минутной ТИП была резко (пикообразно) повышена: у животных с некорригированным обескровливанием — в 10 и 31 раз; на фоне действия фумарата натрия — в 5 и 11 раз; лазикса — в 7 и 18 раз; маннитола — в 9 и 25 раз. Далее следовало постепенное снижение показателя. Нормализация состоялась через две недели у кроликов, защищенных фумаратом натрия независимо от времени ТИП; на одну неделю позже в группах с применением лазикса и на две недели позже у животных с

некорригированной 30-минутной ишемией и у всех особей, получавших маннитол. При завершающих измерениях NGAL в крови оставался повышенным после 60-минутной некорригированной ТИП.

Уровень NGAL в моче также, как и в сыворотке крови, был повышен уже через 2 ч после вмешательства: в 50 и 68 раз у животных, перенесших 30- или 60-минутную ТИП без лекарственной поддержки ($p=0,039$ и $p=0,034$ соответственно), в 23 и 37 раз в группах с применением фумарата натрия ($p=0,02$ и $p=0,005$ соответственно), в 40 и 42 раза у кроликов, получавших лазикс ($p=0,039$ и $p=0,034$ соответственно) и в 41 и 55 раз на фоне действия маннитола ($p=0,010$ и $p=0,001$ соответственно). Затем концентрации анализата поэтапно уменьшались.

Продолжительность тепловой ишемии почки



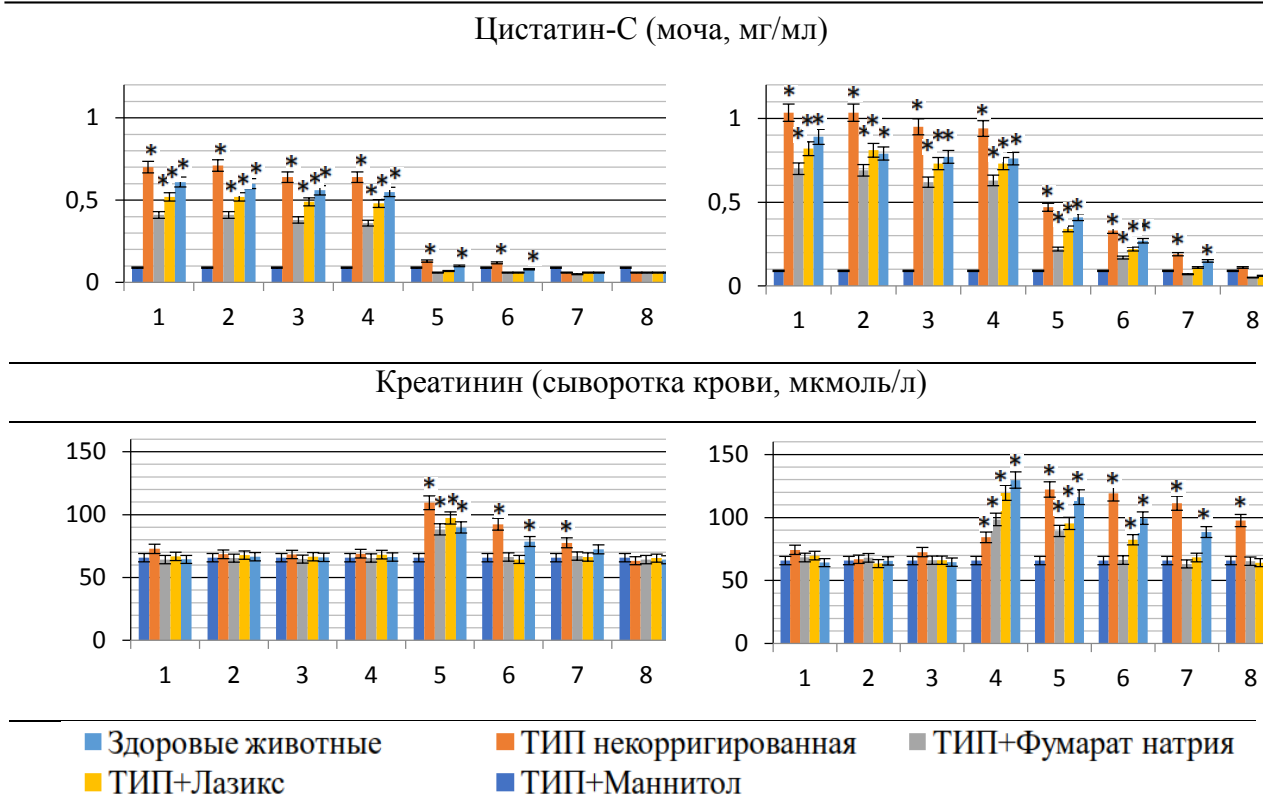


Рис. 4. Влияние состава медикаментозного сопровождения 30- и 60-минутной ТИП на динамику в сыворотке крови и в моче биомаркеров острого почечного повреждения у кроликов через 2 (1), 12 (2), 24 (3) и 72 (4) часа и через 7 (5), 14 (6), 21 (7) и 28 (8) сут после экспериментального вмешательства.

* — статистически значимые различия между показателями у контрольных животных и кроликов из рабочих групп ($p < 0,05$).

Различия с контрольным содержанием NGAL в моче утрачивались в конце периода наблюдения в группах с некорригированной 30- или 60-минутной ТИП и в группах, где использовался маннитол. После постановки опыта и введения лазикса нормализация наступала на одну неделю раньше. У кроликов, защищенных фумаратом натрия, дооперационный уровень NGAL в моче был восстановлен через 1 нед. после 30-минутной ТИП, через 2 нед. после 60-минутного обескровливания.

Содержание в крови цистатина-С после 30- или 60-минутного пережатия почечной артерии без лекарственной поддержки было увеличено в течение всего периода наблюдения с максимумом в первые 2 ч, превышающем значение в фоне на 64% и 85% соответственно. В условиях фумаратопосредованной защиты через 2 ч после 30-минутной ТИП уровень аналита поднялся только на 27 % и нормализовался уже на 7-й день. После введения лазикса значение

показателя в первые 2 ч после 30- или 60-ишемии увеличилось на 42% и 65%, после введения маннитола — на 56% и 72%. Далее показатель постепенно снижался. Нормализация имела место не ранее, чем на 28-е сутки и только у животных с 30-минутной ТИП.

Количество цистатина-С в моче кроликов группы №3 и группы №4 в первые трое суток после некорригированной тепловой ишемии почки, продолжавшейся 30 минут, повысился восьмикратно; после 60-минутной ТИП — двенадцатикратно. Нормализация показателя была отмечена в конце третьей и четвертой недели мониторинга, соответственно.

На фоне действия фумарата натрия в первые 3 дня после ТИП, длившейся 30 мин, содержание цистатина-С в моче увеличилось в 5 раз, однако уже на 7-е сутки восстановилось до исходной величины. При увеличении продолжительности обескровливания до 60 мин уровень данного вещества в моче повышался восьмикратно с

нормализацией не ранее конца 3-й недели от начала эксперимента.

В первые 72 ч после 30- или 60-минутной ТИП и введения лазикса концентрация в моче кроликов цистатина-С возрастала в 6 и 9 раз по сравнению с исходным значением ($p=0,030$ и $p=0,006$ соответственно). Снижение уровня цистатина-С в моче до первоначального наблюдалось на 7-е сутки, если время тепловой ишемии не превышало 30 мин и в конце третьей недели эксперимента после 60-минутного обескровливания.

У животных, получавших маннитол, в первые 72 ч после 30- минутного обескровливания ренальной ткани содержание цистатина-С в моче повысилось в 6–7 раз ($p=0,025$ и $p=0,030$ соответственно); после 60-минутной ТИП — в 8–10 раз ($p=0,032$ и $p=0,011$ соответственно). Далее наблюдалось постепенное уменьшение показателя. Результаты измерений на 21-е и 28-е сутки статистически значимо не отличались от дооперационных значений.

Повышение уровня креатинина в сыворотке крови после моделирования ТИП было отмечено только через 7 дней после 30-минутной ишемии и на 3-и сутки после 60-минутного обескровливания. При этом максимальные концентрации формировались в условиях некорригированной ТИП, менее высокие — на фоне действия маннитола, еще меньше — при использовании лазикса; самые низкие — у животных, получавших фуемарат натрия.

Обсуждение. По результатам проведенного исследования, фуемарат натрия, вводимый внутривенно в разовой дозе 1,5 мл/кг за 24 и 2 ч до экспериментальной операции с моделированием ТИП различной продолжительности (30 или 60 мин), в значительной степени ограничивает выраженность острого ишемического повреждения почечной ткани, главным звеном патогенеза которого является ассоциированное с кислородной депривацией снижение энергетического статуса эпителиоцитов проксимальных почечных канальцев.

Экспериментально это подтверждается, во-первых, различиями ультраструктурных особенностей почечной ткани животных,

перенесших 30- или 60-минутную ТИП на фоне действия фуемарата натрия и без применения какой-либо медикаментозной поддержки, в пользу натриевой соли фуемаровой кислоты; во-вторых, статистически значимыми различиями между особенностями послеоперационной динамики NGAL и цистатина-С в сыворотке крови и в моче, креатинина в сыворотке крови также в пользу фуемарата натрия.

Кроме того, в соответствии с данными, полученными при электронно-микроскопическом исследовании почечной ткани и лабораторном поэтапном анализе уровней содержания в крови и в моче биомаркеров ОПП, нефропротекторная активность фуемарата натрия существенно превосходит таковую у лазикса и маннитола.

Применение янтарной и фуемаровой кислот и их производных в фармакотерапии повреждений, связанных с гипоксией и дефицитом образования макроэнергетических соединений, основано на более позднем подавлении активности FAD-опосредованного сукцинатоксидазного фрагмента цитратного цикла в клетках, лишенных кислорода, по сравнению с NAD-зависимыми звеньями. Следовательно, даже при кислородной депривации существует возможность поддерживать энергообразующую функцию митохондрий в течение определенного времени. Условием для этого является наличие в митохондриях необходимых субстратов, которыми могут быть экзогенные сукцинаты в составе, например, мексидола, цитофлавина или реамберина. Кроме того, пополнение пула митохондриальных сукцинатов может быть обеспечено введением извне сукцинатобразующих соединений, к которым относятся оксипутират натрия, фуемарат натрия и полиоксифумарин.

После экзогенного введения во внутреннюю среду фуемарата натрия и его электролитической диссоциации анионы фуемаровой кислоты (фуемараты) легко преодолевают общеклеточные и митохондриальные мембраны. В митохондриях в условиях гипоксии происходит трансформация фуемаратов в сукцинаты, пополняющие митохондриальный пул субстратов FAD-зависимого сукцинатоксидазного звена цикла

Кребса и увеличивающие за этот счет образование АТФ в течение определенного промежутка времени, например времени теплового обескровливания почки.

Емкость энергетического статуса ишемизированных клеток в период ТИП, обеспечиваемая экзогенным введением фумарата натрия, становится, во-первых, фактором, не допускающим торможения АТФ-зависимого трансмембранного транспорта ионов, альтерации клеточных и внутриклеточных мембран, потерь ионов калия и накопления кальция в гиалоплазме с активацией мембранных фосфолипаз, роста интрацеллюлярного коллоидно-осмотического давления и набухания клеток, высвобождения активных лизосомальных гидролаз, повреждения генетического аппарата клеток и запуска апоптической программы и других нарушений, ведущих к необратимой альтерации и гибели клетки; во-вторых, фактором, способствующим

сохранению функционального потенциала ренальной паренхимы во время ТИП и состоятельности почечной функции в послеоперационном периоде.

Результаты проведенного исследования полностью согласуются с мнением многих исследователей о целесообразности и эффективности применения препаратов антигипоксического типа действия, в частности сукцинатобразующих соединений, для профилактики и коррекции ишемически-гипоксических расстройств в клинической практике.

Выводы:

1. Фумарат натрия оказал наибольшее нефропротекторное действие в отношении ишемии почки у кроликов, затем фуросемид, в то время как маннитол – наименьшее.

2. Применение фумарата натрия позволяет максимально эффективно защищать и стимулировать почечную ткань во время тепловой ишемии почки.

Литература

1. Kuru TH, Zhu J, Popeneciu IV, Rudhardt NS, Hadaschik BA, Teber D, Roethke M. Volumetry may predict early renal function after nephron sparing surgery in solitary kidney patients. *Springer plus*. 2014;3:488. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-488>
2. Mir M.C. Current Paradigm for Ischemia in Kidney Surgery. *J. Urol*. 2016;195(6):1655-1663.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. - Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена; 2018. 236 с.
4. Данилов А.А., Дырдик М.Б., Березин К.В. Результаты дапароскопических вмешательств у больных с опухолями почки. *Медицинский альманах*. 2012;4(23):49-51.
5. Тимербулатов Ш. В., Тимербулатов М. В., Султанбаев А. У. Реперфузионный синдром в абдоминальной хирургии. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2010;4:145-149.
6. Paugam-Burtz C, Wendon J, Belghiti J, Mantz J. Case scenario: Postoperative liver failure after liver resection in a cirrhotic patient. *Anesthesiology*. 2012;116:705-711. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318247227b>
7. Матвеев Б.П. Опухоли почечной паренхимы. В кн.: Б.П. Матвеева, ред. Клиническая онкоурология. М.: АБВ-пресс, 2011:11– 225.
8. Шунькина Г.Л. Роль биохимических исследований в оценке повреждения функции почек новорожденных после перенесенной гипоксии. *Современные технологии в медицине*. 2010;4:104-406.
9. Дряженков И.Г. Комлев Д.Л., Лось М.С. Факторы ишемического повреждения почки при ее резекции. *Клиническая медицина*. 2013;6:21-24.
10. Комяков Б.К., Замятнин С.А., Новиков А.И., Курков А.С., Попов С.В., Товстуха Д.В. и др. Экстракорпоральная резекция почки по поводу опухоли. *Урология*. 2013;4:60–63.
11. Pamer EC. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat. Immunol*. 2007;8(11):1173-1178. <https://doi.org/10.1038/ni1526>
12. Humphreys BD, Czerniak S, DiRocco DP, Hasnain W, Cheema R, Bonventre JV. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108 (22):9226-9231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100629108>
13. Jiang M, Wei Q, Dong G, Komatsu M, Su Y, Dong Z. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. *Kidney Int*. 2012;82(12):1271-1283. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.261>

14. Серегин А.В., Шустецкий Н.А. *Органосохраняющая тактика при раке почки: учебное пособие*. М.: ГБОУ ДПО РМАПО; 2013. 36 с.
15. Patel AR, Eggener SE. Warm ischemia less than 30 minutes is not necessarily safe during partial nephrectomy: every minute matters. *Urol. Oncol.* 2011;29(6):826-828. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.02.015>
16. Thompson R, Lane BR, Lohse CM, Leibovich BC, Fergany A, Frank I et al. Every minute counts when the renal hilum is clamped during partial nephrectomy. *Eur. Urol.* 2010;58:340-345. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.05.047>
17. Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, Leibovich BC, Fergany A, Frank I et al. Renal function after partial nephrectomy: effect of warm ischemia relative to quantity and quality of preserved kidney. *Urology.* 2012;79(2):356-360. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.10.031>
18. Eckle T, Faigle M, Grenz A, Laucher S. A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. *Blood.* 2008;111(4):2024-2035. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-117044>
19. Jia C. Advances in the regulation of liver regeneration. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011;5(1):105-121. <https://doi.org/10.1586/egh.10.87>
20. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2012;298:229-317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
21. Fulop A, Turóczy Z, Garbaisz D, Harsányi L, Szijártó A. Experimental models of hemorrhagic shock: a review. *Eur. Surg. Res.* 2013;50(2):57-70. <https://doi.org/10.1159/000348808>
22. Wen D. Inhibitor of DNA Binding 1 Is Induced during Kidney Ischemia Reperfusion and Is Critical for the Induction of Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Biomed Res. Int.* 2016;46:343-386.
23. Zhang Z. Unilateral Partial Nephrectomy with Warm Ischemia Results in Acute Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 α) and Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Overexpression in a Porcine Model. *PLOS One.* 2016;11(5):154.
24. Курпатовский В.И., Надточий О.Н., Сыромятникова Е.В. Возможности пролонгации допустимых сроков ишемии почки при использовании различных вариантов противоишемической защиты. *Вестник реабилитации органов и тканей.* 2014;1:3-7.
25. Грицкевич А.А., Ильин С.А., Тимина И.Е., Зотиков А.Е., Кармазановский Г.Г., Теплов А.А. и др. Резекция почки ex vivo в условиях фармако-холодовой ишемии без пересечения мочеточника с ортотопической реплантацией сосудов при почечно-клеточном раке. *Вестник урологии.* – 2015;3:3-33. <https://doi.org/10.21886/2308-6424-2015-0-3-3-33>

Для цитирования

Попов С.В., Гусейнов Р.Г., Сивак К.В., Скрябин О.Н., Перепелица В.В., Буненков Н.С., Мальшиев Е.А., Лелявина Т.А. Анализ нефропротекторных свойств антигипоксанта волюмокорректора фумарата при ишемически-реперфузионном синдроме в условиях эксперимента. *Вестник КГМА им. И.К.Ахунбаева.* 2023;3:86-99. https://doi.org/10.54890/1694-6405_2023_3_86

Сведения об авторах

Попов Сергей Валерьевич – д.м.н., профессор, главный врач СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки, руководитель Центра эндоскопической урологии и новых технологий, профессор кафедры урологии ВМедА. г.Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID iD 0000-0003-2767-7153. E-mail: doc.popov@gmail.com

Гусейнов Руслан Гусейнович – к.м.н., заместитель главного врача по научной деятельности СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки, ассистент кафедры госпитальной хирургии Санкт-Петербургского государственного университета. г.Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID iD 0000-0001-9935-0243. E - mail: rusfa@yandex.ru

Скрябин Олег Николаевич – д.м.н., профессор; главный онколог СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки, научный руководитель центра эндоскопической урологии и новых технологий. г.Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID iD 0000-0002-6664-2861.
E-mail: skryabin_55@mail.com

Перепелица Виталий Владимирович - к.м.н., врач уролог СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки. г.Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID iD 0000-0002-7656-4473.
E-mail: perepelitsa_vit@mail.ru

Буненков Николай Сергеевич, к. м. н., научный сотрудник научного отдела СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки, хирург ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, лаборант НИЛ Патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова». г.Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID 0000-0003-4331-028X.
E-mail: bunenkov2006@gmail.com

Малышев Егор Алексеевич – стажер-исследователь СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки. г.Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID iD 0000-0001-6294-6182
E-mail: malyshevyegor@gmail.com

Леявина Татьяна Александровна – научный сотрудник СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки. г.Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID iD 0000-0001-6796-4064
E-mail: tatianalelyavina@mail.com