

ШУНЬКИНА ГАЛИНА ЛЕОНИДОВНА

**Биохимические аспекты диагностики  
нарушений функций почек у  
новорожденных детей, перенесших гипоксию**

**03.01.04 – биохимия**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении Высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия»

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**К.Н. Конторщикова**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор

**А.С. Корягин**

доктор биологических наук

**Т.В. Копытова**

**Ведущая организация:**

ГОУ ВПО «Южный федеральный университет»

Защита состоится «24» февраля 2011 года в « 13 » часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д.23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2011 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета

кандидат биологических наук

**С.В.Копылова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

В последние годы по данным ВОЗ отмечается тенденция к увеличению роста заболеваемости органов мочевыводящей системы у новорожденных детей. Почечная патология занимает второе место в структуре общей заболеваемости детей после болезней органов дыхания и составляет от 15 до 53% . По данным XIV Конгресса педиатров (2010год) число детей в Российской Федерации в возрасте от рождения до 17 лет уменьшилось с 31,6 млн. в 2002 году до 25,4 млн. человек в 2009 году. Ежегодно до 40% детей рождается больными или заболевает в период новорожденности. В среднем, каждый десятый младенец рождается недоношенным и с низкой массой тела.

Частота поражений почек среди детского населения варьирует от 0,4 до 11,8%. По разным источникам, частота инфекций мочевыводящей системы колеблется от 0,1% у доношенных детей и до 10% у недоношенных детей (Баранов А.А., 2005; Игнатова М.С., 2005; Чугунова О.Л., 2006).

При современной экологии и частоте осложненных родов практически у каждого новорожденного отмечается гипоксия той или иной степени тяжести, а у детей, перенесших тяжелую гипоксию, имеющих сопутствующие заболевания и получавших массивную терапию, частота поражений почек значительно возрастает. У новорожденных, находившихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, патология почек развивается приблизительно в 32% случаев.

Перенесенная гипоксия плода и асфиксия в родах являются одной из актуальных проблем современной неонатологии (Абрамченко В.В., Шабалов Н.П. 2004; Баранов А.А., 2005). Острая асфиксия новорожденных – причина смерти приблизительно 1 млн. детей в мире ежегодно. У такого же количества детей развиваются серьезные постгипоксические последствия, в том числе и заболевания мочевыводящей системы, приводящие к ухудшению качества жизни, появлению хронических заболеваний, а в ряде случаев и к инвалидизации (Шабалов Н.П., 2005; Шмелева А.Ю., 2004; Щеплягина Л.А., 2005; Игнатова М.С., 2005).

Важнейшим критерием тяжелой гипоксии является полиорганность поражения, т.е. в патологический процесс вовлекаются все органы и системы новорожденного. Это отмечено у авторов, которые занимались изучением данной проблемы (Клименко П.А., 2002; Лейдерман И.Н., 1999; Лукьянова Л.Д., 2000; Пальчик А.Б., Шабалов Н.П., 2000; Сизов Д.Н. и др., Чугунова О.Л., 2001; Chauhan S.P., 2003; Devarajan P., Woroniecki R., 2006).

Но, несмотря на большое количество работ в данной области, существуют нерешенные проблемы. Влияние гипоксии на развитие и функции органов, в частности почек, недостаточно исследовано.

На метаболические процессы, происходящие в почечной ткани, и функциональное состояние почек новорожденного, несомненное влияние оказывает гестационный возраст и степень морфо-функциональной зрелости органов и тканей ребенка (Polin R.A., 2001; Акоев Ю.С., 1999; Шабалов Н.П., 2005).

Поэтому важным является изучение степени повреждений структурно-функциональных элементов нефрона после перенесенной гипоксии, оценка влияния интенсивной терапии на клубочковый и канальцевый аппарат почек для подбора лечения.

Актуальность данной темы и необходимость дальнейших исследований в этой области позволила сформулировать цель и задачи.

#### **Цель исследования:**

Выявление информативности биохимических показателей крови и мочи с разработкой алгоритма обследования у новорожденных детей после перенесенной гипоксии при развитии почечной патологии.

#### **Задачи исследования:**

1. Исследовать нарушения клубочковой фильтрации по уровню сывороточного креатинина у новорожденных детей.
2. Выявить зависимость состояния канальцевого эпителия от активности ферментов гаммаглутаминтрансферазы и щелочной фосфатазы.
3. Проанализировать роль псевдохолинэстеразы мочи для оценки состояния гломерулярного фильтра.
4. Оценить функциональное состояние почечного эпителия по уровню реабсорбции натрия и секреции калия.
5. Изучить динамику выведения кальция и фосфора у новорожденных, перенесших гипоксию.

#### **Научная новизна**

Впервые проведен дифференцированный анализ нарушений клубочковых и канальцевых функций почек у новорожденных детей в зависимости от срока гестации и вида перенесенной гипоксии.

На основании результатов биохимических исследований установлена ведущая роль поражений канальцевого аппарата в нарушении почечных функций после перенесенной гипоксии.

Проанализированы особенности выведения креатинина при гипоксических поражениях почек в зависимости от срока гестации и вида перенесенной гипоксии.

Предложен комплекс биохимических исследований для ранней диагностики поражений почек после перенесенной гипоксии, включающий в себя определение уровня сывороточного креатинина, активности ферментов в моче, определение экскреторной фракции натрия и их интерпретацию в зависимости от полученных результатов.

### **Практическая значимость работы**

Разработан способ диагностики состояния почек у новорожденных детей, перенесших перинатальную гипоксию различной степени тяжести («Способ диагностики состояния почек у новорожденных» // Патент на изобретение № 2218566 от 03.06.03; Шиленок И.Г., Нестеров С.Л., Козлова Е.М., *Шунькина Г.Л.*, Булдынская Л.И., Музычук Л.Б.).

Предложен и апробирован алгоритм биохимических исследований в оценке состояния почек новорожденных детей после перенесенной гипоксии. Алгоритм биохимических исследований применяется в работе отделения реанимации и интенсивной терапии ДГКБ №1 г.Н.Новгорода.

Полученные результаты и выводы могут использоваться в учебном процессе на кафедре клинической лабораторной диагностики факультета повышения квалификации врачей НижГМА для ознакомления с неинвазивными биохимическими исследованиями новорожденных, а также в преподавании курсов по биохимии для студентов вузов биологического профиля.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Изменения уровней активности ферментов мочи являются биохимическими маркерами повреждений канальцевого и клубочкового эпителия аппарата почек, вызванных перенесенной гипоксией.
2. Уровень экскреции натрия и калия с мочой отражает степень гипоксического поражения проксимальных и дистальных канальцев почек.
3. Причиной повышенного выведения кальция с мочой в критическом состоянии является гипоксическое и токсическое поражение эпителия канальцев.

## **Апробация работы**

Результаты работы обсуждены на клинико-больничной конференции ДГКБ №1 г.Н.Новгорода (2008г), заседании общества неонатологов (Нижний Новгород, 2009), расширенном заседании кафедры клинической лабораторной диагностики (2010г).

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 2 работы в ведущих отечественных журналах, рекомендованных ВАК, 10 статей и тезисов докладов региональных, всероссийских конференций и конгрессов, получен 1 патент на изобретение.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 116 страницах, включая список литературы, и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, результатов собственных исследований и обсуждения, заключения, выводов и библиографического указателя. Список цитируемой литературы включает 209 источников. Диссертационная работа иллюстрирована 8 рисунками, 7 приложениями и 23 таблицами.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования.**

Работа выполнялась на базе Городской детской клинической больницы № 1 г. Нижнего Новгорода в период с 2005 по 2009 год (главный врач Смирнова Л.А.). Анализировалась кровь и моча детей, поступивших на лечение. Диагнозы выставлялись лечащими врачами. Общее количество обследованных – 135 новорожденных детей, поступивших в стационар на первой неделе жизни и 16 детей контрольной группы.

В основную группу вошли новорожденные, находящиеся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии на первой неделе жизни, их состояние оценивалось как крайне тяжелое или очень тяжелое – 106 детей. 16 детей погибли в различные сроки с момента поступления.

Группу сравнения составили новорожденные с неотягощенным перинатальным анамнезом, поступившие в состоянии средней степени тяжести в отделение патологии новорожденных с ОРВИ и локальными гнойно-воспалительными процессами – 29 детей.

Контрольная группа включала практически здоровых детей 4-5 суток жизни, находящихся в родильном доме – 16 детей.

Основная группа была разделена на три подгруппы по сроку гестации: 38-42 недели (доношенные) – 30 детей; 32-37 недель (недоношенные) – 60 новорожденных; 31 неделя и менее (глубоконедоношенные) – 16.

Помимо этого, были выделены следующие группы: дети, перенесшие хроническую гипоксию внутриутробно – 28 новорожденных, острую асфиксию в родах – 23 ребенка и имевшие сочетание острой и хронической гипоксии – 55 детей.

Обследование проводилось в динамике на 1-3, 4-7, 10-14 день жизни и в конце неонатального периода (1 мес. жизни).

Для статистического анализа было использовано деление на группы по степени тяжести перенесенной гипоксии, её характеру и зависимости исследуемых показателей от срока гестации. Учитывалась также наследственность по нефрологической патологии. Достоверных различий по частоте встречаемости заболеваний почек у родственников между детьми основной группы и группы сравнения выявлено не было.

Матери всех детей из основной группы имели отягощенный акушерско – гинекологический анамнез (профессиональные вредности, предшествующие аборт и выкидыши, ИППП, поздние гестозы, анемии и др.).

Всем детям проводились биохимические исследования в сыворотке крови и моче по определенной схеме: исследование уровня креатинина в моче и сыворотке крови кинетическим методом по Яффе без предварительной депротеинизации. Одновременно, в моче исследовалась активность следующих ферментов: псевдохолинэстеразы, гамма-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы кинетическими методами (Виноградова Р.П., 2002, Камышников В.С., 2000, Кишкун А.А., 2007).

Также проводилось определение содержания калия и натрия в сыворотке крови и моче ионселективным методом, уровня кальция и фосфора методом конечной точки, определение содержания ионизированного кальция в плазме крови.

Важной задачей было изучение ферментативной активности мочи в зависимости от состояния больных. Это неинвазивный метод обследования новорожденных, что особенно актуально для недоношенных и детей с малым весом.

В моче содержание ферментов определялось в трехчасовой (с 6-00 до 9-00 утра) порции мочи. Поскольку анализировалась не суточная, а трехчасовая порция мочи, а выделение ферментов подвержено циркадному ритму, активность пересчитывали на миллиграмм выделенного креатинина, так как креатинин в течение дня выделяется с постоянной скоростью.

Активность ферментов измерялась на автоматическом биохимическом анализаторе FLEXOR E производства фирмы VITALAB SENTIFIC (Нидерланды) с использованием реагентов BIOCON (Германия).

Для оценки гломерулярной фильтрации использовалась активность фермента псевдохоллинэстеразы (псевдоХЭ) в моче. ПсевдоХЭ является ферментом, отражающим поражение клубочкового аппарата почек, так как в норме не проходит через гломерулярный фильтр.

К ферментам, характеризующим повреждение или повышение проницаемости мембран почечных канальцев, относят гаммаглутамилтрансферазу (ГГТ) и щелочную фосфатазу (ЩФ).□

Активность ГГТ мочи особенно тесно коррелирует с активностью патологического процесса в почечной ткани, так как этот фермент частично локализован в плазматической мембране, а частично – в комплексе Гольджи. Увеличение активности ГГТ выявляется на ранних стадиях поражения почек.

ЩФ относится к классу ферментов, которые катализируют отщепление остатков фосфорной кислоты от её органических эфирных соединений. ЩФ содержится в щеточной кайме, имеет несколько изоферментов, большую молекулярную массу и в норме не проходит через почечный фильтр. Поэтому при поражениях почек определяется почечная фракция, которая непосредственно отражает повреждения канальцев.

Активность всех ферментов измерялась в Е/л. - международные единицы измерения активности ферментов и пересчитывалась на миллиграмм выделенного креатинина.

Определение уровня креатинина в сыворотке крови и моче проводилось на анализаторе FLEXOR E (Нидерланды) кинетическим методом по Яффе без предварительной депротеинизации.

В моче уровень креатинина колеблется в широких диапазонах, что связано с величиной диуреза, который, в свою очередь, зависит от объема проводимых инфузий, энтерального питания, применения диуретиков.

Содержание общего кальция в сыворотке крови и моче определялось при помощи колориметрического метода с красителем арсеназо III.

Для определения неорганического фосфора использовалась стандартная унифицированная методика с молибдатом аммония. Измерения проводились на автоматическом анализаторе FLEXOR E (Нидерланды).

Исследование уровня калия и натрия в плазме крови и моче, а также ионизированного кальция в плазме крови проводилось на автоматическом анализаторе



газов крови и электролитов ABL 555 фирмы RADIOMETER (Дания) при помощи ионселективных электродов.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы приложения Microsoft - Statistika 6,0. Для установления достоверности различий при сравнении результатов для переменных с нормальным распределением применялся t-критерий Стьюдента, а для переменных с непараметрическим распределением и при сравнении малых групп – Mann-Whitney U test. Проводился однофакторный дисперсионный анализ (параметрический и непараметрический (коэффициент Краскал-Уоллиса)), рассчитывался коэффициент Фридмана-Кендалла для сравнения результатов в динамике, коэффициент корреляции по Спирмену. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

К основным показателям, характеризующим состояние клубочковой функции почек, относят диурез, клиренс веществ, фильтрующихся в почках или их уровень в крови.

В то же время у новорожденных имеются особенности водного обмена и метаболизма креатинина, которые могут затруднять оценку этих показателей. В нашем исследовании суточный диурез новорожденных оценивали в динамике. Дети из основной группы получали больше инфузионной терапии, чем дети из группы сравнения и контрольной группы, а также и лекарственные препараты, стимулирующие диурез. Поэтому исследование проводили в основной группе новорожденных.

Нами получены статистически значимые данные ( $p < 0,05$ ), показавшие, что диурез у новорожденных, перенесших гипоксию, постепенно увеличивается к первым двум неделям жизни, а затем остается стабильным в остальных периодах. У доношенных (38-42 недель) и недоношенных детей (32-37 недель) повышение диуреза было более постепенным, чем у глубоконедоношенных (31 неделя и менее).

Уровень сывороточного креатинина – второй показатель, характеризующий фильтрационную функцию почек.

В группе новорожденных, перенесших гипоксию, креатинин достоверно увеличивался по сравнению с детьми из группы сравнения (показатели группы сравнения совпадают с литературными данными) в течение первого месяца жизни. В 1-3 сутки жизни –  $t = 2,44$ ;  $p = 0,0161$ ; на 4-7 сутки –  $t = 3,35$ ;  $p = 0,0014$ ; на 15-28 день –  $t = 4,11$ ;  $p = 0,0003$ . Отмечено, что уровень креатинина достоверно снижается, начиная со второй недели жизни, но немного отставая по времени от увеличения диуреза.

Различия внутри основной группы оказались достаточно выражены (критерий Краскала-Уоллиса =18,4;  $p=0$ ), внутри группы сравнения не столь значимы, но статистически достоверны (критерий Краскала-Уоллиса = 7,92;  $p=0,0476$ ). Очевидно, что с увеличением диуреза возрастает и клиренс веществ, выводимых почками, а, следовательно, снижается их содержание в крови.

Таким образом, подтверждается предположение о том, что перенесенная гипоксия, отрицательно сказываясь на почечном кровотоке, вызывает снижение скорости клубочковой фильтрации, затем постепенно происходит купирование процесса.

Для анализа некоторых закономерностей, выявленных при изучении динамики суточного диуреза, проанализирован уровень сывороточного креатинина в зависимости от срока гестации и вида перенесенной гипоксии.

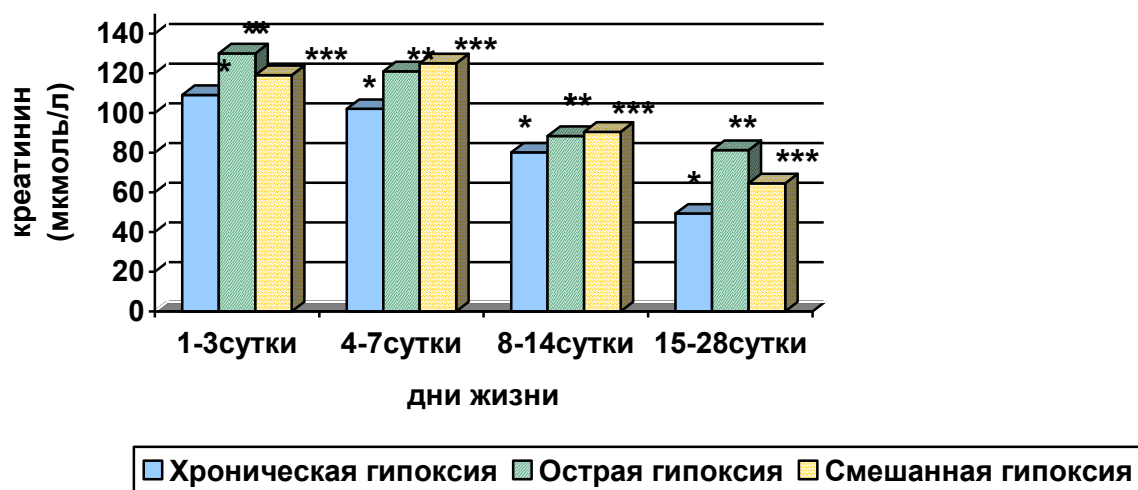
Выявлено, что в первые трое суток жизни новорожденных уровень сывороточного креатинина достоверно не отличался во всех трех группах. Более выраженные изменения наблюдались на второй неделе жизни (коэффициент Краскала-Уоллиса = 6,87;  $p=0,0322$ ). У доношенных детей имело место постепенное снижение уровня сывороточного креатинина, а у глубоконедоношенных вначале наблюдалась тенденция к нарастанию.

Постепенное снижение уровня сывороточного креатинина в течение месяца во всех трех группах статистически значимо ( $F=8,23$ ;  $p=0,0001$ ;  $F=7,07$ ;  $p=0,0003$ ;  $F=9,17$ ;  $p=0$ , соответственно). В то же время у глубоконедоношенных новорожденных уменьшение количества креатинина в сыворотке происходит медленнее.

Было сделано предположение о том, что у глубоконедоношенных детей реабсорбция натрия, а, следовательно, и воды, снижена. В результате при сохраненном диурезе может быть малая фильтрация воды, а главное, креатинина. Следовательно, и клиренс креатинина уменьшается вместе с концентрацией его в моче.

Кроме того, доказано, что при некоторых состояниях креатинин может не только фильтроваться в почках, но и секретироваться и реабсорбироваться клетками канальцевого эпителия (Рябов С.И., Наточин Ю.В., 1997). Если предположить, что профильтровавшийся креатинин вновь активно всасывается в кровь, то увеличение его уровня в крови закономерно. Помимо этого, может нарушаться не только процесс выведения, но и процесс образования креатинина (Дементьев А.А., 1998). В случае, если скорость его образования превышает возможности почек по его выведению даже в условиях нормального функционирования, уровень сывороточного креатинина тоже повысится.

В зависимости от вида перенесенной гипоксии уровень сывороточного креатинина меняется следующим образом (рис.1).



**Рис.1** Динамика уровня сывороточного креатинина (мкмоль/л) у детей основной группы в зависимости от вида перенесенной гипоксии.

- \* - различия между группами статистически значимые ( $p < 0,05$ )
- \*\* - различия между группами статистически значимые ( $p < 0,05$ )
- \*\*\* - различия между группами статистически значимые ( $p < 0,05$ )

Как видно на рис.1, имеет место тенденция к более выраженному снижению уровней сывороточного креатинина у новорожденных, перенесших хроническую гипоксию, по сравнению с острой гипоксией. По всей видимости, это связано с проведением большого количества инфузионной терапии детям из этой группы.

При исследовании выведения креатинина с мочой у детей основной и контрольной групп на первой неделе жизни в зависимости от вида перенесенной гипоксии установлено, что скорость выведения в основной группе составила  $8,13 \pm 2,04$  мкмоль/кг/час, а в контрольной группе  $3,68 \pm 1,6$  мкмоль/кг/час. Различия между группами достоверны:  $t = 4,25$ ;  $p = 0,0001$ .

Полученные результаты подтверждают, что, начиная со второй недели жизни, почки детей, перенесших гипоксию, должны выводить больше креатинина для того, чтобы его уровень в крови нормализовался.

На величину клубочковой фильтрации влияет также и повышение проницаемости гломерулярного фильтра. В моче обнаруживаются белковые молекулы, которые в норме не попадают в просвет почечных канальцев. Таким образом, нарастает протеинурия клубочкового происхождения.

Оптимальным маркером поражения клубочков является фермент псевдохолинэстераза (псевдоХЭ), увеличение его активности в моче свидетельствует о проницаемости гломерулярного фильтра (табл.1).

Таблица 1

**Активность псевдохолинэстеразы мочи (кЕД/мг креатинина) у детей основной группы и группы сравнения.**

Группы	Активность псевдохолинэстеразы (M±m)
Основная группа (n=35)	3,37±0,56*
Контрольная группа (n=16)	2,18±0,81

\*- различия между группами статистически значимые (  $p < 0,05$  )

При статистической обработке данных выяснилось, что активность фермента в моче детей из основной группы достоверно превышает таковую в контрольной группе:  $t=2,628$ ;  $p=0,0116$ . Следовательно, гипоксия вызывает повышение проницаемости гломерулярного фильтра. При изучении влияния вида гипоксии и срока гестации на состояние гломерулярного фильтра выяснилось, что статистически значимой зависимости активности псевдоХЭ от этих факторов нет ( $p>0,05$ ), не отмечено и снижение на первом месяце жизни ( $p>0,05$ ). В то же время имеет место тенденция к увеличению активности псевдоХЭ у глубоконедоношенных детей –  $4,12\pm 1,36$  кЕД/мг креатинина по сравнению с  $2,42\pm 0,82$  у доношенных и  $2,85\pm 0,44$  кЕД/мг креатинина у недоношенных новорожденных.

Увеличение проницаемости гломерулярного фильтра является признаком гипоксического поражения клубочкового аппарата. Отсюда следует, что гипоксия оказывает свое непосредственное влияние на состояние клубочков почек новорожденных детей.

У доношенных детей, перенесших острую асфиксию в родах, в дальнейшем развивается ишемическая нефропатия, характеризующаяся снижением скорости клубочковой фильтрации, снижением диуреза, клиренса эндогенного креатинина и повышением уровня креатинина в сыворотке крови (Байбарина Е.Н., 1999).

У недоношенных детей, перенесших хроническую гипоксию, скорее всего из-за незрелости или истощения стрессовых реакций фаза вазоконстрикции отсутствует, поэтому у детей из этих групп и отмечается относительное увеличение диуреза.

Для подтверждения или исключения деструктивных изменений необходимым явилось определение в моче активности гамма - глутамилтрансферазы ( $\gamma$ -ГТТ) – фермента щеточной каймы тубулярного эпителия проксимальных канальцев. Поскольку этот фермент располагается поверхностно, его активность в моче возрастает даже при незначительных повреждениях. Поэтому в этом случае будет иметь значение не только повреждение почек под действием гипоксии, но и токсическое воздействие

некоторых лекарственных препаратов. Следовательно, в данном случае нельзя ожидать четкой зависимости только от гипоксии.

При определении активности  $\gamma$ -ГГТ в основной и группе сравнения были получены следующие результаты (табл.2).

**Таблица 2**

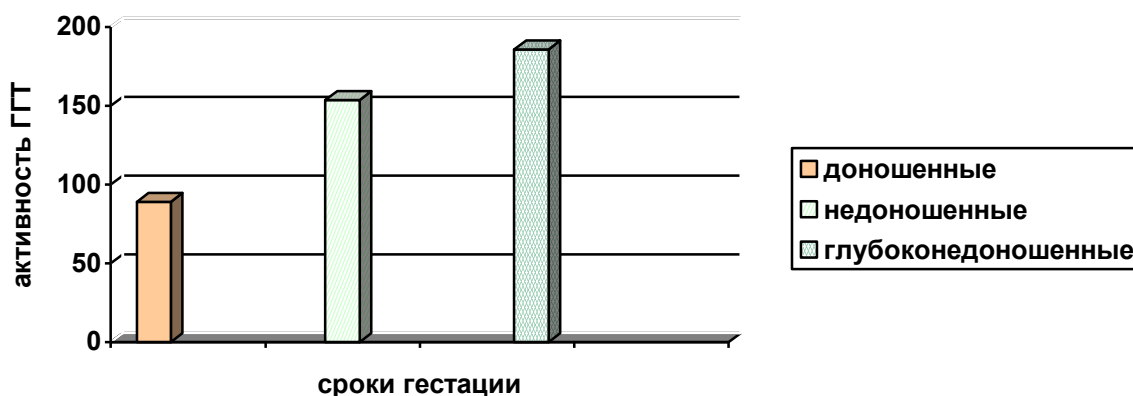
**Активность ГГТ мочи (ЕД/мг креатинина) у детей основной группы и группы сравнения.**

Группы	Активность ГГТ (M $\pm$ m)
Основная группа (n=94)	147 $\pm$ 2,830*
Группа сравнения (n=16)	75 $\pm$ 4,175

\* - различия между группами статистически значимые (  $p < 0,05$ ;  $t = 2,39$ )

Активность ГГТ в моче у детей контрольной группы составила 57,15 $\pm$ 1,70 ЕД/мг креатинина.

Одновременно в основной группе были выявлены индивидуальные различия.. Из 9 погибших детей у 7 отмечалась активность ГГТ более 200 Ед/мг креатинина, что в 4 раза превышало норму, у одного новорожденного был зафиксирован уровень ГГТ мочи 2494,78 Ед/мг креатинина. При исследовании активности ГГТ в зависимости от срока гестации и вида перенесенной гипоксии были получены следующие результаты (рис.2).



**Рис.2 Активность ГГТ мочи (Ед/мг креатинина) у детей основной группы в зависимости от срока гестации.**

Различия между группами статистически значимые ( $p < 0,05$ : критерий Краскалл-Уоллиса =6,307).

Из рис. 2 видно, что с уменьшением гестационного возраста активность ГГТ увеличивается. Отсюда можно заключить, что тубулярный эпителий почек недоношенных

детей более чувствителен к действию повреждающих факторов, и, в первую очередь, гипоксии.

При измерении активности ГГТ от вида перенесенной гипоксии выявилось, что статистически значимых различий между группами нет ( $p > 0,05$ ).

В наших исследованиях наблюдалась тенденция к повышению значений активности при острой асфиксии. При смешанной асфиксии активность ГГТ также была достаточно высокой, но был отмечен большой разброс полученных значений. По всей видимости, в этом случае важную роль играют факторы, вызывающие хроническую и острую гипоксию в каждом конкретном случае и интенсивность их воздействия.

Кроме этого, отмечено, что из 30 детей, обследованных в динамике 2-3 раза с интервалом в 10-14 дней, у 21 зафиксировано повышение уровня ГГТ, а у 3-х из них к концу первого месяца жизни результаты не отличались от нормы. Сходные результаты наблюдались у детей как с исходно высокими, так и низкими значениями активности фермента.

Как следствие, сделано предположение, что это может быть связано с токсическим действием интенсивной терапии. Среди лекарственных средств, назначаемых новорожденным в отделении реанимации и интенсивной терапии, наиболее часто используются потенциально нефротоксические антибиотики (цефалоспорины III поколения в комбинации с аминогликозидами). Одновременно назначается и фуросемид. При этом токсическое действие данных препаратов касается канальцев почек при сохраненной фильтрации.

Вместе с определением активности ГГТ в моче изучалась активность ЩФ в моче. Ее уровень также отражает степень повреждения или повышения проницаемости мембран почечных канальцев (табл.3).

**Таблица 3**

**Активность ЩФ в моче (ЕД/мг креатинина) у детей первой недели жизни.**

Группы	Активность ЩФ (M±m)
Основная (n=27)	129,35±27,13
Сравнения (n=29)	76,25±8,96
Контрольная (n=16)	45,29±4,89

При сравнении биохимических показателей мочи детей из трех групп установлены статистически достоверные данные (коэффициент Краскала-Уоллиса =28,18;  $p=0$ ). Из полученных данных видно, что активность ЩФ в основной группе значимо выше, что связано с гипоксическим поражением почек. При сравнении активности ЩФ в моче в

зависимости от возраста детей получено, что на 4-7 день жизни различия между группами были статистически значимыми ( $t=2,39$ ;  $p=0,019$ ). К 10-14 дню достоверных различий не было выявлено ( $t=1,61$ ;  $p=0,113$ ). В дальнейшем к концу неонатального периода различия между группами были статистически значимыми ( $t=2,97$ ;  $p=0,0077$ ). К концу неонатального периода повышенный уровень активности ЩФ в основной группе отражает токсические повреждения канальцевого аппарата.

Кроме того, обнаруживалась положительная корреляция между активностью ЩФ мочи и ГГТ мочи на 4-7 день в основной группе ( $r=0,505$ ;  $p=0,0139$ ), на 10-14 день ( $r=0,505$ ;  $p=0,0139$ ). Видимо, это связано с тем, что эти ферменты располагаются в щеточной кайме канальцевого эпителия, который повреждается в самом начале действия гипоксии. На 28-30 день корреляция не выявлена ( $r=0,0607$ ;  $p=0,829$ ), поскольку в этом случае на передний план выступают уже токсические поражения.

В то же время между активностью псевдоХЭ мочи и ЩФ мочи корреляции нет ( $r=0,29$ ;  $p=0,14$ ). Это связано с тем, что псевдоХЭ отражает проницаемость гломерулярного барьера и попадает туда из кровяного русла, а ЩФ находится непосредственно в щеточной кайме канальцевого эпителия.

Отсюда следует, что перенесенная гипоксия той или иной степени тяжести вызывает поражение эпителия почечных канальцев с нарушением целостности щеточной каймы, при этом более опасной является острая асфиксия и/или смешанная гипоксия.

Очевидно, что почки недоношенных детей более уязвимы для повреждающего действия гипоксии. Кроме того, почки новорожденных, перенесших гипоксию, подвержены действию проводимой интенсивной терапии, и это необходимо учитывать при выборе схемы лечения антибиотиками.

Результаты исследований, представленные выше, отражают более грубые, деструктивные изменения, происходящие в почках после перенесенной гипоксии.

#### **Результаты изучения функции почечных канальцев.**

Следующим этапом исследования было изучение более тонких, функциональных изменений. Для этого изучали экскрецию натрия с мочой, лучше всего характеризующую реабсорбционную функцию проксимальных канальцев. Экскреторная фракция натрия представляет собой соотношение содержания натрия и креатинина в сыворотке к их концентрации в моче (табл.4).

Таблица 4

**Экскреторная фракция натрия (%) у новорожденных детей основной группы и группы сравнения**

Группы	Экскреторная фракция натрия
Основная группа (n=48)	2,02±0,07
Группа сравнения (n=5)	0,42± 0,08

У детей из основной группы эксcretорная фракция натрия была достоверно выше ( $t=32,2$ ;  $p<0,05$ ), чем у детей из группы сравнения, а результаты группы сравнения совпали с результатами в контрольной группе.

Далее этот показатель был проанализирован в зависимости от срока гестации и вида перенесенной гипоксии.

Таблица 5

**Экскреторная фракция натрия (%) у новорожденных детей в зависимости от срока гестации.**

Срок гестации	Экскреторная фракция натрия (M±m)
Доношенные дети (n=19)	1,34±0,58
Недоношенные дети (n=15)	3,72±1,15
Глубоконедоношенные дети (n=16)	0,965±0,20

Различия между группами достоверны: ( $F=4,328$ ;  $p=0,018$ )

Из таблицы видно, что эксcretорная фракция натрия у глубоконедоношенных детей ниже, чем у недоношенных и доношенных детей. Следовательно, увеличение диуреза в этой группе не может быть связано со снижением реабсорбции натрия.

По все видимости, имеет место снижение реабсорбции воды на уровне собирательных трубочек (снижение секреции или отсутствие чувствительности к действию антидиуретического гормона) или же развивается большой диурез за счет сохранения фильтрации, как и предполагалось ранее. У недоношенных новорожденных эксcretорная фракция натрия выше, чем у доношенных детей, что, скорее всего, связано с активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы.

При анализе эксcretорной фракции натрия в зависимости от перенесенной гипоксии имели место большие индивидуальные разбросы результатов. Поэтому при статистической обработке оказалось, что различия между группами недостоверны ( $p>0,05$ ). В то же время эксcretорная фракция натрия повышается у детей, перенесших острую асфиксию, что может быть связано с повреждающим действием гипоксии на



эпителий почечных канальцев. Данный факт был подтвержден при анализе активности ГГТ в моче.

Для оценки вклада деструктивных нарушений в функциональные изменения проведен корреляционный анализ по Спирмену. В результате получен значительный коэффициент корреляции между активностью ГГТ мочи и экскреторной фракцией натрия ( $r = 0,3883$ ;  $z = 2,797$ ;  $p = 0,0025$ ). Отсюда следует, что гипоксия оказывает свое повреждающее действие на канальцы почек. При этом при острой асфиксии это поражение более выражено, что и подтверждается нарастанием активности ГГТ в моче.

При хронической гипоксии в первые трое суток после родов сосудистая реакция отсутствует, поэтому не наблюдается картины ишемической нефропатии. В этой группе новорожденных детей не отмечено увеличения реабсорбции натрия и, следовательно, снижения диуреза.

Функциональные нарушения (например, увеличение экскреции натрия) могут быть вызваны наличием морфологических изменений в почечных канальцах, это проявлялось в увеличении активности ГГТ в моче.

В почках глубоко недоношенных детей происходят более сложные изменения. Вместе с высоким диурезом, выраженным повышением ГГТ в моче, выявлена низкая экскреция натрия с мочой. Вероятно, у этих детей имеет место снижение ответной реакции почек на действие антидиуретического гормона и натрийуретического пептида (возможно, что их меньше вырабатывается). Эти гормоны регулируют выведение натрия и воды на уровне собирательных трубочек.

Функциональное состояние дистальных канальцев почек оценивалось по экскреции калия с мочой. В результате не было выявлено достоверных различий между основной и контрольной группами ( $p > 0,05$ ), а также зависимости величины его выведения от вида перенесенной гипоксии и срока гестации.

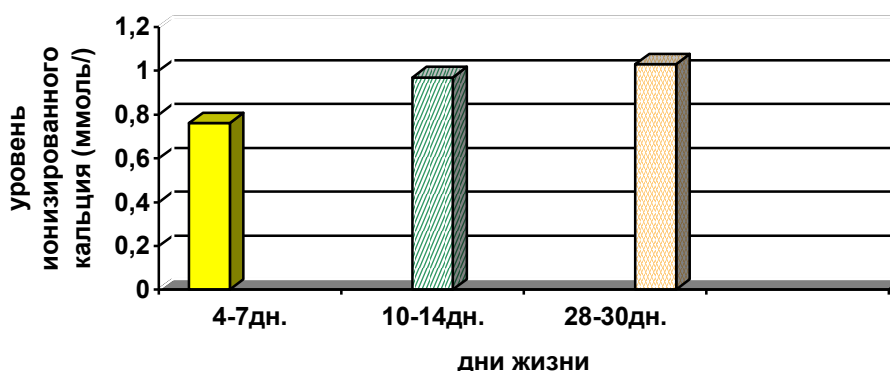
В то же время, корреляционный анализ по Спирмену между величиной экскреции калия и активностью ГГТ мочи, продемонстрировал выраженную корреляционную зависимость:  $r = 0,8111$ ;  $z = 8,049$ ;  $p = 0$ . Так как калий является основным внутриклеточным ионом, то его повышение в моче при гипоксическом поражении почечных канальцев может быть объяснено снижением реабсорбции за счет дефицита энергии, а также его выхода из клеток. Поэтому у новорожденных, перенесших гипоксию, происходит поражение как дистальных, так и проксимальных канальцев.

Одной из задач исследования была оценка кальциево-фосфорного обмена у доношенных новорожденных, перенесших гипоксию.

При исследовании уровня общего кальция у новорожденных, перенесших тяжелую гипоксию, в большинстве случаев были получены результаты, соответствующие возрастной норме (2,0 – 3,25 ммоль/л). Но в то же время имел место разброс данных от 1,51 ммоль/л до 3,24 ммоль/л. Гипокальцемию, вероятно, можно объяснить тем, что у новорожденных из-за тяжести состояния питание было энтеральным и в минимальных объемах, а препараты кальция для внутривенного введения применялись не всегда. Но несколько случаев гиперкальциемии не могут быть объяснены только неадекватной инфузионной терапией. Возможно, в данном случае могло иметь место транзиторное нарушение функции паращитовидных желез, что, несомненно, требует отдельного исследования.

Далее в динамике уровень общего кальция этих детей возвращался к норме, клинических проявлений гипо- и гиперкальциемии не выявлено. На 10-11, 28-30 день уровень общего кальция у всех детей не отличался от нормы. Таким образом, все имеющиеся на первой неделе жизни отклонения содержания общего кальция в сыворотке крови при адекватной инфузионной терапии вернулись к нормальным значениям уже к концу второй недели жизни.

Содержание ионизированного кальция в плазме крови выглядело следующим образом (рис.3).



**Рис.3 Концентрация ионизированного кальция в плазме крови детей основной группы (ммоль/л).**

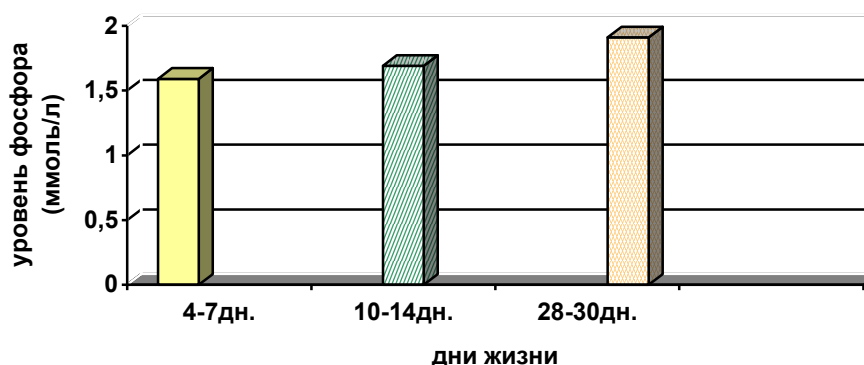
Коэффициент Фридмана-Кендала =9,75;  $p=0,0076$ . По данным литературы нормальная концентрация ионизированного кальция у новорожденных детей составляет 1,0 – 1,18 ммоль/л.

Гипокальцемию обнаруживалась в большинстве случаев. Гиперкальцемию не наблюдалось ни у одного из обследованных детей. Возможно, это связано с проводимой интенсивной терапией: все дети находились на искусственной вентиляции легких. При

этом значение рН поддерживалось на верхней границе нормы, а зависимость уровня ионизированного кальция от рН общеизвестна.

Уровень ионизированного кальция нормализовался медленнее, чем содержание общего кальция в сыворотке крови, причем даже к концу неонатального периода у ряда новорожденных было зафиксировано незначительное снижение уровня ионизированного кальция в сыворотке крови.

При измерении содержания фосфора в сыворотке крови новорожденных детей, перенесших гипоксию, получены следующие данные (рис.4).



**Рис.4 Концентрация неорганического фосфора сыворотки крови у детей основной группы (ммоль/л).**

Коэффициент Фризмана - Кендала =6,94;  $p=0,031$ . Нормальная концентрация фосфора 1,3 – 2,26 ммоль/л (по данным литературы).

При анализе полученных данных выявлен большой диапазон колебаний значений: от 0,57 ммоль/л до 2,65 ммоль/л в конце первой и второй недели жизни. К концу неонатального периода показатели уровня фосфора не отличались от нормы, но гипофосфатемия была выявлена у многих новорожденных, особенно у находившихся на полном парентеральном питании.

Анализируя содержание общего кальция и фосфора в сыворотке крови новорожденных, перенесших тяжелую гипоксию, можно сделать вывод о постепенной стабилизации показателей и нормализации кальциево-фосфорного обмена к концу неонатального периода.

С помощью исследования мочи мы уточнили состояние кальциево-фосфорного гомеостаза у детей в критическом состоянии и у детей, перенесших гипоксию средней степени тяжести. Для оценки результатов были использованы кальций/креатининовый и фосфат/креатининовый коэффициенты (табл. 6).

Таблица 6

**Значение кальций/креатининового коэффициента на первой неделе жизни (ммоль/ммоль выделенного креатинина)**

Группа	диапазон	медиана	95 перцентиль
Основная	0,068 – 2,35	0,457	1,14
Сравнения	0,045 – 7,74	0,173	0,34
Контрольная	0,004 – 0,169	0,037	0,076

Коэффициент Краскал-Уоллиса =39,5;  $p=0,0001$ . Выведение кальция было достоверно выше у детей основной группы, самые низкие уровни оказались характерными для детей контрольной группы (здоровые новорожденные). У новорожденных детей, перенесших гипоксию средней степени тяжести, наблюдались промежуточные результаты.

Таким образом, высокий уровень выведения кальция у новорожденных, находящихся в критическом состоянии, может быть связан с тяжелым гипоксическим и токсическим поражением почек, которые сопровождаются повреждением канальцевого эпителия. Это было подтверждено высоким уровнем корреляции между выведением кальция и активностью ГГТ в моче:  $r=0,248$ ;  $p=0,023$ .

При изучении динамики выведения кальция в зависимости от возраста новорожденных детей показано, что выведение кальция нарастало с возрастом, однако различия не были статистически значимыми ( $p=0,625$ ).

Максимальные значения были отмечены в конце второй - начале третьей недели жизни, что совпало с большими объемами проводимой медикаментозной терапии. В конце неонатального периода выведение кальция с мочой снижалось, но не доходило до нормы.

Выведение фосфора с мочой сравнивалось в группах детей на первой неделе жизни. При этом получены следующие результаты (табл. 7).

Таблица 7

**Значения фосфат/креатининового коэффициента у детей первой недели жизни (ммоль/ммоль креатинина).**

Группа	диапазон	медиана	95 перцентиль
Основная	0,050 – 5,94	0,181	0,73
Сравнения	0,039 – 5,62	1,2	1,85
Контрольная	0,042 – 2,73	0,566	1,4

Коэффициент Краскала – Уоллиса =18,2;  $p=0,0001$ . Выявлено значительное повышение коэффициента у детей из группы сравнения и резкое снижение в основной группе по сравнению с контрольной группой. Закономерностей как таковых выявлено не было в связи с большим разбросом данных. В динамике в группе сравнения значения коэффициента не менялись, но у детей основной группы обнаружилось повышение коэффициента к концу первого месяца жизни (табл.8).

**Таблица 8**

**Динамика величины фосфат/креатининового коэффициента в основной группе (ммоль/ммоль креатинина).**

Возраст	диапазон	медиана	95 перцентиль
4-7 дней	0,050 – 5,94	0,181	0,73
10-14 дней	0,048 – 4,68	0,23	1,36
28-30 дней	0,147 – 6,42	1,79	3,63

Коэффициент Краскал – Уоллиса =9,87;  $p=0,0071$ , различия достоверны. В то же время нормализовались показатели содержания общего кальция и ионизированного кальция, а также уровень фосфора в сыворотке крови. Функции почек также стабилизировались к концу неонатального периода.

Одновременно были выявлены различные деформации грудной клетки, связанные с участием вспомогательной мускулатуры в акте дыхания, мягкие края швов и родничка. Все новорожденные находились на энтеральном питании, дополнительно кальций не получали.

В связи с этим был сделан вывод, что возможно причиной гиперфосфатурии является состояние, подобное рахиту недоношенных детей, и заключается в повышении активности паратгормона на фоне недостаточного поступления кальция.

Таким образом, при развитии почечной патологии после перенесенной гипоксии происходит нарушение клубочковой фильтрации, что вызывает повышение уровня креатинина в крови. Недостаток кислорода приводит к нарушению энергетического обмена, в результате происходит уменьшение концентрации АТФ в клетке, что влечет за собой ингибирование фосфофруктокиназы – основного фермента гликолиза. Затем происходит активация анаэробного гликолиза, частично компенсирующая недостаток АТФ, но быстро вызывающая накопление лактата, дальнейшее развитие ацидоза и постепенно прогрессирующее собственное ингибирование.

Возникающий ацидоз приводит к нарушению ферментативных реакций. В дальнейшем это способствует усиленному распаду фосфолипидов и белков, а,

следовательно, деструктивным изменениям в клеточных структурах. Происходят разрушения наружных клеточных и цитоплазматических мембран тубулярного эпителия почечных канальцев и содержащиеся там ферменты активно поступают в мочу, что подтверждается нарастанием ферментурии.

Деструктивные изменения при дальнейшем действии гипоксии переходят в функциональные, что выражается в нарушении функций проксимальных и дистальных канальцев. Острая асфиксия вызывает более серьезные нарушения, чем другие виды гипоксии. Глубоконедоношенные дети сильнее подвержены повреждающему действию гипоксии.

## **ВЫВОДЫ**

1. Нарушения клубочковой фильтрации проявляются в основном снижением скорости фильтрации и соответствующим повышением уровня креатинина в сыворотке крови.
2. Активность ГГТ и ЩФ в моче достоверно отражает состояние эпителия канальцев на фоне перенесенной гипоксии и длительной медикаментозной нагрузки. Повышение уровня ГГТ в моче характеризует также и токсическое действие проводимой терапии.
3. Псевдохолинэстераза (псевдоХЭ) является маркером поражения клубочков почек. Увеличение активности псевдоХЭ в моче свидетельствует о нарушении проницаемости гломерулярного фильтра и гипоксическом поражении клубочков.
4. Экскреция натрия с мочой характеризует реабсорбционную функцию проксимальных канальцев, достоверно повышаясь у детей, перенесших острую асфиксию. Состояние дистальных канальцев оценивается при помощи экскреции калия с мочой.
5. Выявлен высокий кальциево-креатининовый коэффициент мочи в течение первого месяца жизни. Корреляция этого коэффициента с ГГТ может быть обусловлена гипоксическими и токсическими поражениями эпителия канальцев и совпадением с максимальным уровнем медикаментозной нагрузки.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:**

1. Нестеров С.Л. Поражение почечных канальцев у новорожденных в критических состояниях / Нестеров С.Л., Шиленок И.Г., Козлова Е.М., Шунькина Г.Л. и др. // Российский педиатрический журнал – 2004 - №3. – с.26-28

2. Шунькина Г.Л. Роль биохимических исследований в оценке повреждений функций почек новорожденных после перенесенной гипоксии /Шунькина Г.Л.// Современные технологии в медицине. – 2010 - №4. – с. 65-68

3. Способ диагностики состояния почек у новорожденных // Патент на изобретение № 2218566 от 03.06.03 / Шиленок И.Г., Нестеров С.Л., Козлова Е.М., **Шунькина Г.Л.**, Булдынская Л.И., Музычук Л.Б.// «Изобретения, полезные модели». Официальный бюллетень российского агентства по патентам и товарным знакам. – Москва, 2003. - №23. – с.52

## **II. Статьи, тезисы докладов региональных, всероссийских и международных конференций:**

1. Нестеров С.Л. Причины повышения креатинина у недоношенных /Нестеров С.Л., Шиленок И.Г., Козлова Е.М., **Шунькина Г.Л.**, Булдынская Л.И., Музычук Л.Б. // Материалы II Всероссийского конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2003г.). – Москва, 2003. – с.201

2. Нестеров С.Л. Нарушения канальцевых функций почек у новорожденных при тяжелой гипоксии /Нестеров С.Л., Шиленок И.Г., Козлова Е.М., **Шунькина Г.Л.**, Булдынская Л.И., Новожилов А.В., Чурин С.П., Музычук Л.Б.// Материалы V Российского Форума «Мать и дитя» (Москва, 2003г.). – Москва, 2003. – с.538-539

3. Нестеров С.Л. Клинико-лабораторно-морфологические параллели при постгипоксической нефропатии у новорожденных /Нестеров С.Л., Шиленок И.Г., Козлова Е.М., Радовский В.В., **Шунькина Г.Л.** и др.// Проблемы клинической педиатрии: Межвузовский сборник научных трудов, посвященный 60-летию кафедры госпитальной педиатрии НГМА/ под ред. С.Л. Нестерова. И.Г. Шиленка. – Н.Новгород: Изд-во НГМА, 2004 – с.5-12

4. Нестеров С.Л. Особенности метаболизма креатинина у новорожденных при гипоксии/ Нестеров С.Л., Шиленок И.Г., Козлова Е.М., **Шунькина Г.Л.** и др.// Проблемы клинической педиатрии: Межвузовский сборник научных трудов, посвященный 60-летию кафедры госпитальной педиатрии НГМА/ под ред. С.Л. Нестерова. И.Г. Шиленка. – Н.Новгород: Изд-во НГМА, 2004 – с.13-19

5. Козлова Е.М. Ранние осложнения перинатальной гипоксии /Козлова Е.М., Шкалова Л.В., Халецкая О.В., **Шунькина Г.Л.**, Булдынская Л.И.// Ремедиум. Приволжье. Специальный выпуск журнала «Медицина – женщинам», 2005 – с. 29-30

6. Козлова Е.М. Особенности кальциево-фосфорного обмена у новорожденных в критических состояниях /Козлова Е.М., **Шунькина Г.Л.**, Халецкая О.В.// Материалы VI

Российского Конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2007). – Москва, 2007. – с.128

7. Халецкая О.В. Полиорганные поражения у новорожденных при тяжелой гипоксии / Халецкая О.В., Козлова Е.М., **Шунькина Г.Л.**, Булдинская Л.И., Шкалова Л.В.// Медицинский альманах. - №1, 2007. – с.84-88

8. Козлова Е.М. Информативность исследования функций почек при перинатальной гипоксии / Козлова Е.М., Халецкая О.В., **Шунькина Г.Л.**, Булдинская Л.И. // Новые подходы к диагностике и лечению заболеваний у детей// сборник статей под ред. проф. О.В.Халецкой. – Нижний Новгород; изд-во НГМА, 2008. – с.52-55

9. Козлова Е.М. Полиорганный недостаток у новорожденных при тяжелой гипоксии / Козлова Е.М., Халецкая О.В., Князева Е.В., **Шунькина Г.Л.** и др. //Материалы III Междисциплинарного Конгресса «Ребенок, врач, лекарство». – СПб. 2008. – с.55-58

10. Шунькина Г.Л. Биохимические особенности крови и мочи новорожденных с почечной патологией, развившейся на фоне перенесенной гипоксии /Шунькина Г.Л., Козлова Е.М., Конторщикова К.Н., Халецкая О.В.// Тезисы докладов конференций. Лаборатория, №2 – Москва, 2010 – с.11-12

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

ИН – ишемическая нефропатия

КЭК – клиренс эндогенного креатинина

ОПН – острая почечная недостаточность

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

псевдоХЭ – псевдохолинэстераза

ЩФ – щелочная фосфатаза

ГГТ – гаммаглутамилтрансфераза