

УДК 616.366-003.7-089
ББК 54.57

ОЦЕНКА ВЫРАЖЕННОСТИ ПОРТОСИСТЕМНОГО ШУНТИРОВАНИЯ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ У КРЫС С ПОРТАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

АРЕФЬЕВ Н.О., КАЗАЧКОВ Е.Л., ГАРБУЗЕНКО Д.В., ЗОТОВА М.А., КОЧКИНА О.Т.
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия
e-mail: nikolai.arefyev@gmail.com

Аннотация

По данным литературы, ангиогенез в брыжейке тонкой кишки является пусковым механизмом портосистемного коллатерального кровообращения при портальной гипертензии. Одним из триггеров его развития может быть воспалительная реакция в брыжейке тонкой кишки, возникающая в результате транслокации бактерий через её стенку в регионарные лимфатические узлы. Цель исследования: оценить наличие и выраженность бактериальной транслокации и портосистемного шунтирования у крыс с портальной гипертензией на 7 сутки от создания модели. Результаты. У крыс с моделью портальной гипертензии не было обнаружено бактериальной транслокации как культуральным методом, так и с помощью ПЦР. При этом, наблюдалось значительное увеличение портосистемного шунтирования у этих животных (65,19 [53,98; 78,97]), в отличие от контрольной (0 [0; 0], $p=0,07$) и ложно-оперированной групп (5,73 [4,84; 7,30], $p=0,09$). Заключение. В проведённой нами предварительной экспериментальной работе наблюдалось значительное увеличение портосистемного шунтирования у крыс с моделью портальной гипертензии и отсутствие бактериальной транслокации. Для установления связи между этими процессами необходимы дальнейшие исследования на более ранние сроки от создания модели.

Ключевые слова: портальная гипертензия, портосистемное шунтирование, микросферы, бактериальная транслокация, ангиогенез.

Актуальность. По данным литературы, ангиогенез в брыжейке тонкой кишки является пусковым механизмом портосистемного коллатерального кровообращения при портальной гипертензии (ПГ) [5]. Одним из триггеров его развития может быть воспалительная реакция в брыжейке тонкой кишки, возникающая в результате транслокации бактерий через её стенку в регионарные лимфатические узлы. Для оценки бактериальной транслокации при предпечёночной ПГ в эксперименте используют культуральные методы исследования лимфатических узлов брыжейки тонкой кишки, которые, однако, позволяют обнаружить её лишь на ранние сроки (2-3 сутки) после создания модели [6]. В то же время, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) обладает большей чувствительностью [7], но не применялась для детекции бактерий на более поздних сроках.

Цель работы. Оценить наличие и выраженность бактериальной транслокации и портосистемного шунтирования у крыс с ПГ на 7 сутки от создания модели.

Материалы и методы. Все представленные процедуры с животными выполнялись в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных ("Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", eighth edition, NIH Publication, 2011), а также были согласованы с независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Исследования проводились на 15 половозрелых самцах крыс линии Wistar массой 300 ± 20 г, которые были разделены поровну на три группы: контрольную, ложно-оперированную и опытную. Их содержали при 12-часовом световом дне, контролируемой температуре и влажности воздуха в пластиковых клетках размером 47 см x 34 см x 18 см, выстланных древесной щепой. Крысы получали комбинированный корм и воду ad libitum.

В отличие от контрольных животных, крысам опытной группы создавали модель предпечёночной ПГ. После анестезии (Золетил®, 40 мг/кг внутривенно) и срединной лапаротомии воротная вена тщательно

выделялась из окружающих тканей проксимальнее места слияния селезёночной и верхней брыжеечной вен и перевязывалась шёлковой нитью 4-0 на расположенном рядом с её стенкой катетере диаметром 0,9 мм, после чего он извлекался, создавая откалиброванный стеноз воротной вены [1]. Животным ложно-оперированной группы выделяли воротную вену, однако лигатуру не накладывали.

Во время релапаротомии на 7 сутки эксперимента у крыс опытной и ложно-оперированной групп, а также у интактных крыс контрольной группы измерялось портальное давление. Исследование проводилось дифференциальным манометром Testo 510 (Германия), соединённым с катетером диаметром 0,6 мм, установленным в дистальную часть верхней брыжеечной вены. Рассчитывалось среднее арифметическое максимального и минимального значений, полученных в течение 5 минут контроля давления. Для предотвращения тромбообразования животным обеих групп непосредственно перед измерением вводили гепарин внутривенно болюсно в дозировке 300 ЕД/кг.

Лимфатические узлы илеоцекального отдела брыжейки тонкой кишки забирали в стерильных условиях и измельчали для последующего посева на питательную среду Эндо методом мазков-отпечатков. Рост колоний оценивали через 24 и 48 часов после инкубации в аэробных условиях при температуре 37°C.

Для проведения количественной ПЦР 10 мг измельчённых лимфатических узлов гомогенизировали в 500 мкл физиологического раствора при помощи ультразвукового соникатора (ООО "МЭЛФИЗ-ультразвук", г. Москва). Выделение ДНК из образцов проводили с помощью набора "АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ", а для выявления и количественного определения ДНК энтеробактерий семейства Enterobacteriaceae (включая E.coli, Klebsiella spp., Proteus spp. и др.), стафилококков (Staphylococcus spp.) и стрептококков (Streptococcus spp.) применяли набор "АмплиПрайм® Флороценоз-Аэробы" (ООО "ИнтерЛабСервис", Москва). Результаты оценивали с помощью прилагаемого производителем программного обеспечения.

Для оценки выраженности портосистемного шунтирования, приблизительно 60000 жёлтых

полистироловых микросфер диаметром 15 мкм (DyeTrak VII+, Triton Technology, США) вводили в верхнюю брыжеечную вену в течение 30 секунд. После выведения животного из эксперимента, печень и лёгкие помещались в полипропиленовые центрифужные пробирки, куда было добавлено 15000 голубых микросфер с целью контроля процесса обработки образцов. Количество микросфер в каждом образце определяли, руководствуясь инструкциями производителя. Ткань переваривали в 1М КОН при 50°C в течение 14 часов, а затем гомогенизировали с помощью ультразвукового соникатора (ООО "МЭЛФИЗ-ультразвук", г. Москва), после чего центрифугировали при 1500 g. Надосадочную жидкость удаляли, и осадок отмывали, используя 10% раствор Тритон X-100, подкисленный этанол и 95% этанол. Преципитат, содержащий микросферы, высушивали в течение 12 часов при температуре 50°C. Для обесцвечивания микросфер и элюирования красителя к их осадку добавляли 400 мкл подкисленного 2-этоксиэтилацетата. Абсорбцию каждого образца определяли методом фотометрии по конечной точке с холостой пробой по реагенту на длине волны 405 и 630 нм, используя флуориметр Флюорат-02-3М (АО "Аквилон", г. Москва). Число микросфер подсчитывали путём сравнения со стандартами, при этом пересекающийся диапазон голубого и жёлтого корректировали методом матричной инверсии. Портосистемное шунтирование было рассчитано как отношение микросфер в лёгких по отношению к их суммарному количеству в лёгких и печени.

Данные представлены в виде М (медиана) и [Q1; Q3] (квартили). Статистическая значимость была рассчитана с использованием программы IBM SPSS Statistics. U-критерий Манна-Уитни и критерий Краскела-Уоллеса были использованы для сравнения между группами. Критический уровень отклонения нулевой гипотезы был принят за $p < 0,05$ (то есть, уровень значимости 5%).

Результаты исследования. Портальное давление у крыс опытной группы было достоверно выше, чем контрольной и ложно-оперированной: соответственно 13,6 [12,01; 14,18], 6,5 [6,06; 7,0] и 8,0 [7,52; 8,2] ($p=0,009$) что подтверждает развитие ПГ после частичного лигирувания воротной вены (табл. 1).

Таблица 1
Величина портального давления у крыс на 7
сутки эксперимента

| № | Портальное давление (мм.рт.ст.) | | |
|---|---------------------------------|----------------------------|----------------|
| | Контрольная группа | Ложно-оперированная группа | Опытная группа |
| 1 | 5,00 | 8,20 | 12,01 |
| 2 | 6,06 | 7,52 | 11,00 |
| 3 | 6,50 | 9,10 | 13,60 |
| 4 | 7,00 | 8,00 | 14,18 |
| 5 | 7,00 | 7,45 | 14,67 |

Выраженность портосистемного шунтирования в опытной группе составила 65,19 [53,98; 78,97], и в то же время была минимальна в контрольной и ложно-оперированной группах (0 [0; 0] ($p=0,07$) и 5,73 [4,84; 7,30] ($p=0,09$)), что означает развитие портосистемного коллатерального кровотока до 93% у крыс с ПГ на 7 сутки после создания модели (табл. 2). При этом, между всеми группами выявлены статистически достоверные различия как в значениях портального давления, так и портосистемного шунтирования ($p=0,02$).

Таблица 2
Выраженность портосистемного шунтирования у крыс на 7 сутки эксперимента

| № | Портосистемное шунтирование (%) | | |
|---|---------------------------------|----------------------------|----------------|
| | Контрольная группа | Ложно-оперированная группа | Опытная группа |
| 1 | 4,77 | 7,29 | 92,93 |
| 2 | 0 | 9,79 | 78,97 |
| 3 | 0 | 4,41 | 65,18 |
| 4 | 0 | 4,84 | 53,98 |
| 5 | 0 | 5,73 | 29,73 |

Ни в одной группе не было обнаружено роста колоний на среде Эндо через 48 часов инкубации. При этом, только ДНК семейства Enterobacteriaceae была выявлена в образцах лимфатических узлов у одного животного как в контрольной, так и в опытной группе (2326 ГЭ/мл и 2348 ГЭ/мл).

Обсуждение. Нами проведено экспериментальное исследование, в котором оценены наличие и выраженность портосистемного шунтирования и бактериальной транслокации у крыс с предпечёночной ПГ на 7 сутки от создания

модели по сравнению с ложно-оперированной и контрольной группой.

В 1981 году М. Chojkier и R.J. Groszmann предложили для оценки степени портосистемного шунтирования использовать ^{51}Cr -меченые микросферы [2]. Модификация этой методики с их заменой на цветные полистироловые получила широкое распространение в настоящее время, поскольку это исключает работу с опасным радиоактивным материалом при сохранении точности исследования [8].

Так, с помощью микросфер было выявлено, что у крыс с моделью ПГ, вызванной частичным лигированием воротной вены, порто-системные коллатерали начинают образовываться уже на вторые сутки после её создания [3].

В развитии портосистемных шунтов важную роль может играть бактериальная транслокация, которая стимулирует ангиогенез в брыжейке тонкой кишки [9], приводящий к развитию портосистемного коллатерального кровообращения и гипердинамического циркуляторного статуса [4].

У крыс с предпечёночной ПГ наличие живых бактерий в лимфоузлах брыжейки на 2 сутки после создания модели подтверждено методом их посева на питательные среды. При этом, рост колоний на более длительные сроки не наблюдается [10], что может быть связано с развитием портосистемного шунтирования и снижением портального давления на 5 сутки от создания модели, предположительно приводящим к уменьшению отёка и ишемии стенки тонкой кишки, а, следовательно, и бактериальной транслокации [6].

В настоящем исследовании выраженность портосистемного шунтирования у крыс опытной группы статистически значимо превышала показатели такового в группах сравнения. Однако, нами не обнаружено значимых различий между группами как по данным культурального исследования, так и количественной ПЦР.

Выводы. В проведённой нами экспериментальной работе наблюдалось значительное увеличение портосистемного шунтирования у крыс с моделью ПГ. При этом, метод количественной ПЦР не подтвердил наличие бактериальной транслокации у крыс с предпечёночной ПГ на 7 сутки от создания модели. Для изучения её причин и роли на

более ранние сроки требуются дальнейшие исследования.

Список литературы

1. Арефьев Н.О. Выбор оптимальной методики частичного лигирования воротной вены при моделировании внепечёночной портальной гипертензии / Н.О. Арефьев, Д.В. Гарбузенко // Вестник совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – 2016. – №1. – С. 14-19.
2. Chojkier M. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using γ -labeled microspheres / M. Chojkier, R.J. Groszmann // *Am J Physiol.* – 1981. – №240. – G371-G375.
3. Fernandez M. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice / M. Fernandez [et al.] // *Gastroenterology.* – 2004. – №126. – P. 886-894.
4. Garbuzenko D.V. Antiangiogenic therapy for portal hypertension in liver cirrhosis: Current progress and perspectives / D.V. Garbuzenko, N.O. Arefyev, E.L. Kazachkov // *World J Gastroenterol.* – 2018. – №33. – P. 3738-3748.
5. Garbuzenko D.V. Restructuring of the vascular bed in response to hemodynamic disturbances in portal hypertension / D.V. Garbuzenko, N.O. Arefyev, D.V. Belov // *World J Hepatol.* – 2016. – №36. – P. 1602-1609.
6. Garcia-Tsao G. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension / G. Garcia-Tsao [et al.] // *Hepatology.* – 1993. – №6. – P. 1081-1085.
7. Hernandez Oliveros F. Critical assessment of the methods used for detection of bacterial translocation / F. Hernandez Oliveros [et al.] // *Pediatr Surg Int.* – 2004. – №4. – P. 267-270.
8. Hodeige D. On the validity of blood flow measurement using colored microspheres / D. Hodeige [et al.] // *Am J Physiol.* – 1999. – №276. – H1150–H1158.
9. Moghadamrad S. Attenuated portal hypertension in germ-free mice: Function of bacterial flora on the development of mesenteric lymphatic and blood vessels / S. Moghadamrad [et al.] // *Hepatology.* – 2015. – №5. – P. 1685-1695.
10. Neugebauer H. Bacterial translocation increases phagocytic activity of polymorphonuclear leucocytes in portal hypertension: priming independent of liver cirrhosis / H. Neugebauer [et al.] // *Liver Int.* – 2008. – №8. – P. 1149-1157.

THE ASSESSMENT OF PORTOSYSTEMIC SHUNTING AND BACTERIAL TRANSLOCATION IN RATS WITH PORTAL HYPERTENSION

AREFYEV N.O., KAZACHKOV E.L., GARBUZENKO D.V., ZOTOVA M.A., KOCHKINA O.T.
 FSBEI HE SUSMU MOH Russia, Chelyabinsk, Russia
 e-mail: nickolya.gir@mail.ru

Abstract

Background: according to the literature, angiogenesis in the mesentery of the small intestine is the trigger for portosystemic collateral circulation in portal hypertension. One of the reasons for vessel growth may be an inflammatory reaction in the mesentery of the small intestine, resulting from the translocation of bacteria through small intestinal wall into the regional lymph nodes.

Objective: to assess the presence and severity of bacterial translocation and portosystemic shunting in rats with portal hypertension on the 7th day after model creation.

Results. In rats with a model of portal hypertension, bacterial translocation was detected neither by using cultural method nor by using PCR. At the same time, a significant increase in portosystemic shunting was observed in these animals (65.19 [53.98; 78.97]), in contrast to the control (0 [0; 0], $p = 0.07$) and sham-operated group (5.73 [4.84; 7.30], $p = 0.09$).

Conclusion: in the present study, we observed a significant increase in portosystemic shunting in rats with a model of portal hypertension and the absence of bacterial translocation. To establish the relationship between these processes, further research is needed at earlier time periods from the moment of model creation.

Keywords: portal hypertension, portosystemic shunting, microspheres, bacterial translocation, angiogenesis.