

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАЛАНСА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ



Резюме. В связи с многокомпонентностью редокс-системы определение отдельных ее показателей не отражает развитие дисбаланса про- и антиоксидантов. Методом люминолзависимой хемилюминесценции плазмы крови у 45 пациентов до и после трансплантации почки изучен баланс редокс-системы. Через 24 часа после операции наблюдалось его смещение в сторону прооксидантов по сравнению с дооперационными показателями. Это свидетельствует об активации процессов свободнорадикального окисления и истощении запасов антиоксидантов с развитием окислительного стресса. Определение параметров про- и антиоксидантного баланса крови оптимизирует мониторинг за состоянием пациента после пересадки почки, позволит повысить точность диагностики и начать коррекцию выявленных нарушений.

Ключевые слова: про- и антиоксидантный баланс, трансплантация почки, окислительный стресс.

Успех хирургического вмешательства при трансплантации почки в значительной степени обусловлен своевременной диагностикой и коррекцией нарушений гомеостаза. Современные методы диагностики дисфункции аллотрансплантата основываются

на определении в крови некоторых химических маркеров, таких как уровень азота креатинина или мочевины. Однако это относительно суррогатные показатели, поскольку повреждение структуры трансплантата должно предшествовать нарушению его функции. Для мониторинга посттрансплантационных реакций предложен ряд лабораторных исследований, однако золотым стандартом остается гистологическое исследование биоптата [1]. Наличие ряда ограничений к применению данного метода требует разработки новых диагностических подходов, с общим принципом – неприкасаемости к пересаживаемому органу.

Трансплантация почки сопровождается временным прекращением кровотока в донорском

МЕДИЦИНА

органе, что неизбежно приводит к его ишемии с последующей реперфузией. Патогенез возникающих и развивающихся при этом нарушений включает дефицит кислорода, активацию свободно-радикального окисления (СРО) – стимуляцию перекисного окисления липидов (ПОЛ), приводящего к изменению структуры и функции клеточных мембран, а также к изменению антиоксидантных свойств [2]. Нарушение баланса между интенсивностью про- и антиоксидантных процессов вызывает окислительный стресс и, как следствие, повреждение клеточных и субклеточных структур продуктами СРО и усугубление патологического состояния. Поэтому в клинической практике для контроля за течением патологической реакции и оптимизации тактики ведения пациентов после трансплантации может быть использована оценка про- и антиоксидантного баланса [3–5]. В связи с многокомпонентностью этой системы организма человека определение отдельных ее показателей не да-

ет представления о том, носят ли выявляемые сдвиги компенсаторный характер или являются отражением оксидативного стресса, то есть не позволяет оценить, идет ли речь о балансе или о дисбалансе редокс-системы [3, 5–7]. Данный недостаток успешно преодолевается за счет использования методов хемилюминесцентного анализа биологических жидкостей, которые основаны на изучении интенсивности свечения, возникающего при переходе вещества из возбужденного состояния в стабильное [7–9].

Цель настоящего исследования – изучить динамику показателей про- и антиоксидантного баланса организма у пациентов до и после аллотрансплантации почки.

Проанализированы результаты обследования 45 пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5-й стадии (группа «О»), поступивших в хирургическое отделение (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) Республиканского научно-практического центра ради-

ационной медицины и экологии человека (РНПЦ РМ и ЭЧ) для проведения аллотрансплантации почки. Возраст пациентов составлял от 28 до 62 лет. Среди них было 20 мужчин (44,5%) и 25 женщин (55,5%). Клиническое исследование выполнялось с информированного согласия пациентов и одобрения комитетом по этике РНПЦ РМ и ЭЧ.

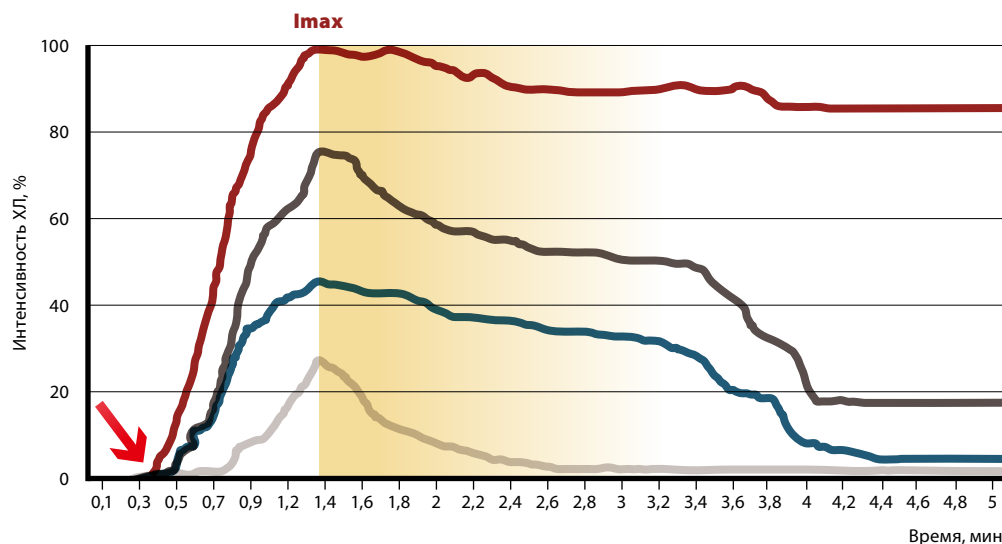
В контрольную группу «К» вошли практически здоровые люди (n = 41). Сравнительный анализ изучаемых показателей не выявил статистически значимых различий в зависимости от пола и возраста пациентов и лиц контрольной группы, что позволило не учитывать гендерные и возрастные характеристики. Клиническое исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (1975) и одобрено комитетом по этике Гомельского государственного медицинского университета.

Лабораторные исследования выполняли на базе лаборатории клеточных технологий РНПЦ РМ и ЭЧ. Оценивали состояние

Рисунок. Типичные кривые люминолзависимой хемилюминесценции

- кривая ЛЗХЛ здоровых лиц
- кривая ЛЗХЛ пациентов до трансплантации
- кривая ЛЗХЛ после операции
- кривая ЛЗХЛ радикалообразующей смеси

Примечание: стрелкой указан момент внесения в радикалообразующую смесь 3% раствора перекиси водорода



про- и антиоксидантного баланса плазмы крови методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) до трансплантации почки и через 24 часа после операции. С целью стандартизации использовали подход, основанный на сравнении интенсивности ЛЗХЛ радикалообразующей системы в присутствии биологического материала и без него. Регистрацию ЛЗХЛ плазмы крови осуществляли на флуориметре/спектрофотометре Cary Eclipse FL1002M003 (Variant, USA) с автоматическим определением максимальной интенсивности свечения ($I_{\max}$), светосуммы хемилюминесценции (S). Для расчетов результатов исследования ежедневно параллельно с опытными пробами проводили контрольные. В качестве последних использовали приготовленную *ex tempore* радикалообразующую смесь, состоящую из 1 мл трис-буфера (pH=8,8), 0,1 мл 25 ммоль/л раствора сернокислого железа, 0,1 мл 0,01% раствора люминола и 0,1 мл физиологического раствора. Инициацию ЛЗХЛ вызывали добавлением в кювету 0,1 мл 3% раствора перекиси водорода, после чего в течение 5 минут производили регистрацию ЛЗХЛ в автоматическом режиме, чтобы обеспечить точность и объективность информации. Полученные данные обрабатывали в соответствии с приложенным к прибору пакетом программ, результаты фиксировали в цифрах и графически (рисунки) [4–6].

Основной показатель ЛЗХЛ – степень угнетения интенсивности свечения ($I_{\max}$) плазмы крови – рассчитывали по формуле: $((I_{\max_k} - I_{\max_o}) / I_{\max_k}) \times 100\%$, где $I_{\max_k}$ – интенсивность свече-

Показатель	Группа «К», n=41	Группа «О», n=45	
		до операции	после операции
$I_{\max}$, %	78,0 [71,9; 89,7]	44,2 [30,5; 51,8]*	16,9 [7,7; 22,3]**
S , %	64,9 [54,1; 66,3]	34,9 [18,3; 53,7]*	22,3 [6,9; 37,1]**

Примечание:

* – значимо по сравнению с показателем группы «К» при $p < 0,05$ (U-критерий Манна – Уитни);

** – значимо по сравнению со значением до операции при $p < 0,05$ (критерий Уилкоксона).

Таблица. Показатели про- и антиоксидантного баланса плазмы крови пациентов групп «О» и «К» (Me [Q25; Q75])

ния ЛЗХЛ радикалообразующей смеси, $I_{\max_o}$ – интенсивность свечения ЛЗХЛ исследуемого материала (плазмы). Результат выражали в процентах относительно контроля. Интенсивность ЛЗХЛ ($I_{\max}$) зависит от взаимодействия оксидантов и антиоксидантов и наиболее точно отражает про- и антиоксидантный баланс организма [6].

Такой подход к оценке про- и антиоксидантного баланса плазмы крови позволяет нивелировать колебания значений ЛЗХЛ, связанные с использованием реагентов разных фирм, а также сопоставлять результаты, полученные в различных лабораториях с применением различного оборудования и биологического материала [6].

Данные обрабатывали в программе «Statistica 6.1» (StatSoft, GS-35F-5899H), с выполнением теста Шапиро – Уилка и использованием непараметрических методов статистического анализа, поскольку результаты не подчинялись нормальному закону распределения. Количественные параметры представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й (LQ) – нижний квартиль и 75-й (UQ) – верхний квартиль). Для сравнения двух зависимых групп применяли кри-

терий Уилкоксона, для независимых групп («О» и «К») – U-критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы принимали равным и менее 0,05.

В результате исследования выявлено, что у здоровых лиц значения $I_{\max}$ и S плазмы крови составили 78,0 (71,9; 89,7)% и 64,9 (54,1; 66,3)% соответственно. У пациентов с терминальной стадией ХБП устойчивость баланса про- и антиоксидантов в плазме крови до операции – 44,2 [30,6; 51,8]%, мощность антиоксидантной системы – 34,9 [18,3; 52,7]%. Трансплантация почки у этих пациентов уже через 24 часа вызвала смещение баланса до 16,9 [7,7; 22,3]%, снижение мощности антирадикальной системы до 22,3 [6,9; 37,1]% (таблица).

В дооперационном периоде у пациентов с терминальной стадией ХБП значения $I_{\max}$ и S были меньше, чем в группе здоровых лиц (U-критерий Манна – Уитни, $p=0,003$ и $p=0,001$ соответственно). Через 24 часа после трансплантации почки отмечалось снижение показателей $I_{\max}$ и S по сравнению с аналогичными параметрами до операции (критерий Уилкоксона, $p=0,022$, $p=0,028$ соответственно). Выявленные изменения свидетель-

МЕДИЦИНА

ствуют об активации процессов свободнорадикального окисления и истощении запасов антиоксидантов в организме у реципиентов.

Снижение интенсивности ЛЗХЛ плазмы крови (I_{max}) после трансплантации по сравнению с дооперационными значениями в 2,6 раза и светосуммы хемилюминесценции (S) в 1,5 раза свидетельствует о том, что в раннем послеоперационном периоде происходит активация процессов свободнорадикального окисления и развивается недостаточность антиоксидантной защиты, что характеризует начальную стадию оксидативного стресса. Эти изменения в состоянии про- и антиоксидантного статуса организма, вероятно, связаны с увеличением концентрации в крови недоокисленных продуктов метаболизма, накопившихся в период ишемии аллотрансплантата и поступления их в общий кровоток при реперфузии [10, 11]. Как следствие, ускоряется каскад свободнорадикальных процессов, требующих от организма реципиента определенной готовности и степени активности системы антиоксидантной защиты.

Таким образом, для выявления нарушений баланса про- и антиоксидантной системы у лиц после аллотрансплантации в раннем послеоперационном периоде может быть использован метод люминолзависимой хемилюминесценции плазмы крови. Оптимизация мониторинга за состоянием пациента после операции путем расширения спектра исследований позволит повысить точность диагностики. ■

Статья поступила в редакцию 14.09.2017 г.

Татьяна Петренко,

доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, кандидат медицинских наук, доцент; Petrenko_T.S@mail.ru

Сергей Зыблев,

доцент кафедры хирургических болезней №2 Гомельского государственного медицинского университета, кандидат медицинских наук, доцент; S.zyblev@yandex.by

Залимхан Дундаров,

завкафедрой хирургических болезней №2 Гомельского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор; surgery_2@gsmu.by

Светлана Зыблева,

врач-иммунолог, ученый секретарь РНПЦ радиационной медицины и экологии человека, кандидат медицинских наук; zyb-svetlana@yandex.by

Александр Величко,

заведующий хирургическим отделением (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) РНПЦ радиационной медицины и экологии человека, кандидат медицинских наук, доцент; velichkoav@rambler.ru

SUMMARY

There were analyzed the indices of pro/ antioxidant balance of the blood plasma of 45 patients with CKD of stage 5 before and in 24 hours after kidney homeotransplantation. Indices of pro-/antioxidant balance were calculated by method luminal-dependent chemiluminescence of blood plasma, with detection of maximum lumenescence intensity (I_{max}), chemiluminescence light sum (S). The results of the study were presented in % to the respect to LCM indices of radical forming mixture in the presence of the physiological solution (control). The shifting of pro/ antioxidant balance towards prooxidants is observed within the renal transplant recipients in 24 hours which was expressed in descent of I_{max} and S in comparison with the same indices before transplantation (Wilcoxon test p=0,022, p=0,028 respectively). The identified changes indicate about activation of radical-free oxidation process and antioxidant supply exhaustion. Oxidative stress is being developed within the patients with CKD of stage 5 after transplantation, so the detection of the indices of the pro/antioxidant balance of blood plasma in renal transplantant recipients will let to expand the range of examinations for monitoring the patient status after the surgery.

Key words: pro/antioxidant balance, kidney transplantation, oxidative stress.

ЛИТЕРАТУРА

1. Первакова Э. И. Выбор метода заместительной почечной терапии у больных с отсроченной функцией трансплантата почки в раннем послеоперационном периоде / Э. И. Первакова, И. В. Александрова, А. Г. Балкаров // Трансплантология. 2012. № 3. С. 5–15.
2. Лобанов Н. А. Спорные вопросы влияния уремической интоксикации и свободнорадикальных процессов на развитие у больных анемии при терминальной стадии хронической почечной недостаточности / Н. А. Лобанов, Н. Н. Боровков // Медицинский альманах. 2010. № 3 (12). С. 152–155.
3. Владимиров Ю. А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях / Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7, № 1. С. 16–23.
4. Беляков Н. А. Антиоксидантная активность биологических жидкостей человека: методология и клиническое значение / Н. А. Беляков, С. Г. Семеско // Эфферентная терапия. 2005. Т. 11, № 1. С. 5–21.
5. Петренко Т. С. Характеристика параметров люминолзависимой хемилюминесценции липидов плазмы крови пациентов с рецидивирующими респираторными инфекциями / Т. С. Петренко, И. А. Новикова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2013. № 1. С. 68–75.
6. Петренко Т. С. Методологические подходы к оценке хемилюминесценции плазмы крови / Т. С. Петренко, И. А. Новикова, А. В. Гомоляко // Чернышевские чтения – 2012: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 19–20 апреля 2012 г. / РНПЦ медицины и экологии человека; под общ. ред. А. В. Рожко. – Гомель, 2012. С. 214–217.
7. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А. П. Шепелев [и др.] // Вопросы медицинской химии. 2000. Т. 46, № 2. С. 110–116.
8. Измайлов Д. Ю. Определение активности антиоксидантов методом измерения кинетики хемилюминесценции / Д. Ю. Измайлов, Е. М. Демин, Ю. А. Владимиров // Фотобиология и экспериментальная фотомедицина. 2011. № 2. С. 70–76.
9. Владимиров Ю. А. Лекции по медицинской биофизике: учебное пособие / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина. – М., 2007.
10. Ischemia-reperfusion injury kidney transplantation from non-heart-beating donor – do antioxidant or anti-inflammatory drugs play any role? / V. Treska [et al.] // Bratisl. Lek. Listy. 2009. Vol.110, N3. P. 133–136.
11. Неспецифические механизмы ишемического и реперфузионного повреждения почечного аллотрансплантата и способы воздействия на них / А. В. Ватазин [и др.] // Нефрология. 2013. Т. 17, № 1. С. 42–48.