

Зыблев С.Л.¹, Петренко Т.С.¹, Зыблева С.В.², Дундаров З.А.¹, Величко А.В.²

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

Zyblev S.¹, Petrenko T.¹, Zybleva S.², Dundarov Z.¹, Velichko A.²

¹ Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

² Republican Research Center of Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

Развитие окислительного стресса при ишемически-реперфузионной травме

Development of oxidative stress in patients
with ischemia-reperfusion injury

Резюме

Введение. В белорусской медицине трансплантация органов и тканей – одно из самых динамично развивающихся направлений.

Цель исследования. Оценить степень нарушения баланса про-/антиоксидантной системы организма при ишемически-реперфузионной травме в посттрансплантационном периоде

Материалы и методы. Проанализированы результаты обследования 55 пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5-й стадии, которым выполнена трансплантация почки. Оценивали состояния про-/антиоксидантного баланса методом люминолзависимой хемилюминесценции плазмы крови до операции и через 24 часа после операции. Изучали устойчивость баланса про-/антиоксидантов в плазме крови (I_{max}), мощность антиоксидантной системы (S), антирадикальную активность (t). Для определения влияния анестезиологического пособия и оперативного вмешательства на состояние про-/антиоксидантного баланса организма исследовали также группу пациентов, которым выполнялась полостная операция под наркозом.

Результаты и обсуждение. В результате исследования выявлено, что у пациентов с ХБП 5-й стадии уже в течение первых суток после трансплантации почки происходит смещение баланса про-/антиоксидантов в сторону прооксидантов и недостаток антиоксидантов, а также наблюдается тенденция к снижению антирадикальной активности. В свою очередь у пациентов после планового оперативного лечения значимого изменения со стороны показателей про-/антиоксидантного баланса плазмы крови не выявлено.

Степень изменения показателей про-/антиоксидантного баланса плазмы крови может быть использована для определения тяжести ишемически-реперфузионной травмы.

Ключевые слова: ишемически-реперфузионная травма, трансплантация почки, окислительный стресс.

Abstract

Introduction. Transplantation of organs and tissues in Belarus is one of the fastest growing areas.

Purpose of the study. Rate the degree of imbalance prooxidant and antioxidant system during ischemia-reperfusion injury in the post-transplant period.

Materials and methods. There were analyzed the results of examination of 55 patients with chronic kidney disease (CKD) of the 5th stage, who underwent kidney transplantation. The state of the pro-/antioxidant balance was assessed with the method of luminal-dependent chemiluminescence of blood plasma before the surgery and in 24 hours after it. We studied the stability of the balance of pro-/antioxidants in plasma (I_{max}), the antioxidant capacity of the system (S), and antiradical activity (A). We also studied the group of patients who underwent abdominal surgery under general anesthesia to determine the effect of anesthesia and surgery on the condition of pro-/antioxidant balance of the body.

Results and discussion. The study revealed that the shift of the balance of the pro-/antioxidants to the prooxidants and the lack of antioxidants take place in patients with CKD of the 5th stage during the first 24 hours after kidney transplantation. There was also observed the tendency of decrease of antiradical activity. At the same time, there were no significant changes of the indices of the pro-/antioxidant balance in blood plasma of patients who underwent elective surgery.

Conclusion. The degree of changes of the indices of the pro-/antioxidant balance in blood plasma can be used for determination of the severity of ischemia-reperfusion injury.

Keywords: ischemia-reperfusion injury, kidney transplantation, oxidative stress.

■ ВВЕДЕНИЕ

В белорусской медицине трансплантация органов и тканей – одно из самых динамично развивающихся направлений. По количеству трансплантаций на 1 млн населения мы занимаем первое место в СНГ. В 2014 г. так называемая трансплантационная активность в Республике Беларусь составила 43,6 операций на 1 млн населения. Для примера: в Польше этот показатель был равен 42,1, в России – 9,8, в Украине – 3,4. В 2015 г. трансплантационная активность в Республике Беларусь выросла до 47,0 операций на 1 млн населения [1].

Трансплантация почки сопровождается временным прекращением кровотока в донорском органе, что неизбежно приводит к ишемии органа с последующей реперфузией. Таким образом, первичным при трансплантации является ишемическое и реперфузионное повреждение (ИРП) донорского органа различной степени тяжести. Ишемические и реперфузионные повреждения являются многофакторной патологией, влияющей на раннюю и отдаленную функцию аллотрансплантата. По экспериментальным данным E.A. Kouwenhoven, ишемическое и реперфузионное повреждение аллотрансплантата почки (АТП) приводит к более раннему развитию эпизодов острого отторжения. По литературным данным тяжелые ИРП встречаются до 30% случаев, что сопровождается некрозом эпителия канальцев нефрона с развитием острой почечной недостаточности трансплантата и замедленной его функции. Несмотря на успехи трансплантологии, достижения в современной иммуносупрессивной терапии, этот показатель остается на прежнем уровне последние десять лет, что указывает на немаловажную роль ИРП в развитии дисфункции донорского органа [2].

Отсроченная функция трансплантата в раннем послеоперационном периоде является важной клинической проблемой, встречающейся в 6–78,4% случаев [3]. Этиологические факторы и патогенетические

механизмы развития первично нефункционирующего трансплантата не полностью изучены, несмотря на высокий научный интерес и практическую значимость. Наряду с иммунологическими факторами в патогенезе первично нефункционирующего трансплантата участвует и ряд неиммунных звеньев, среди которых ведущее значение принадлежит ишемически-реперфузионным повреждениям [4, 5]. Однако большинство определяемых клинических, инструментальных и лабораторных признаков не являются строго специфичными для верификации причин почечной дисфункции. Общепризнанно, что морфологические методы исследования являются наиболее достоверными в дифференциальной диагностике не только патологических, но и функциональных процессов, протекающих в пересаженной почке. В то же время ряд морфологических изменений не всегда являются строго специфичными для того или иного вида осложнений. Сама методика является инвазивной, имеющей ряд осложнений, а морфологическое исследование занимает длительное время. В настоящее время не существует неинвазивных, точных и быстрых в исполнении способов диагностики дисфункции почечного трансплантата [6, 7].

Своевременная диагностика и адекватная коррекция нарушений гомеостаза во время трансплантации почки во многом обуславливают конечный успех хирургического вмешательства. Наиболее опасными с этой точки зрения этапами операции являются ишемия при изъятии органа у донора и реперфузия трансплантата при включении его в кровотоки реципиента. Патогенез органных нарушений, возникающих и развивающихся во время ишемии и реперфузии, включает дефицит кислорода, активацию свободнорадикальных процессов – стимуляцию перекисного окисления липидов (ПОЛ), приводящего к изменению структуры и функции клеточных мембран, а также изменение антиоксидантных свойств [8–10].

Известно, что активация свободнорадикального окисления (СРО) является универсальной неспецифической реакцией организма, которая необходима для обеспечения нормальных метаболических и адаптационных процессов в организме [11].

В то же время нарушение баланса между интенсивностью прооксидантных и антиоксидантных процессов, когда компенсаторная активация антиоксидантов не способна предотвратить повреждающее действие прооксидантов, приводит к развитию окислительного стресса. В таких ситуациях происходит повреждение клеточных и субклеточных структур продуктами СРО, и течение патологического процесса усугубляется. Поэтому в клинической практике оценка про-/антиоксидантного баланса может быть использована для контроля за течением патологического процесса и оптимизации тактики лечения. Как про-, так и антиоксидантная составляющая редокс-системы организма представлена большим количеством веществ, обладающих разнообразными свойствами, выполняющих определенные функции в клетке, а их соотношение при ряде патологических состояний изменяется. В связи с многокомпонентностью про-/антиоксидантной системы определение отдельных ее показателей не дает представление о том, носят ли выявляемые сдвиги компенсаторный характер или являются отражением оксидативного стресса, то есть оценить, идет ли речь о балансе или дисбалансе [12, 13].

В этой связи особое значение принадлежит совершенствованию методов диагностики. К интенсивно разрабатываемым способам контроля

за состоянием реактивности организма относится хемилюминесцентный метод определения про-/антиоксидантного баланса. Метод люминофорзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) плазмы крови позволяет определить характер расстройств и степень компенсации в системе про-/антиоксидантов организма. Известно, что уровень ЛЗХЛ, с одной стороны, определяется образованием свободных радикалов (СР), а с другой – зависит от наличия антиоксидантов (АО) в системе [14].

Таким образом, несмотря на актуальность проблемы, до настоящего времени нет единого подхода в диагностике нарушений баланса про-/антиоксидантного состояния организма при ишемически-реперфузионном повреждении в посттрансплантационном периоде.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить степень нарушения баланса про-/антиоксидантной системы организма при ишемически-реперфузионной травме в посттрансплантационном периоде.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы результаты обследования 55 пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5-й стадии (группа «Т»), находившихся на лечении в хирургическом отделении (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦ РМиЭЧ»), которым была проведена трансплантация почки. Возраст составлял от 21 до 65 лет, мужчин – 30 (55%), женщин – 25 (45%). Клиническое исследование проведено с информированного согласия пациентов и одобрено комитетом по этике ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» и УО «ГомГМУ». Для определения влияния анестезиологического пособия и оперативного вмешательства на состояние про-/антиоксидантного баланса организма исследовали группу пациентов, которым выполнялось плановое оперативное лечение под наркозом (группа «Д»). Эту группу составили 20 пациентов, оперированных по поводу послеоперационной вентральной грыжи ($n=14$) и которым выполняли абдоминопластику по поводу ожирения ($n=6$).

Лабораторные исследования выполняли на базе лаборатории клеточных технологий ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Оценку состояния про-/антиоксидантного баланса оценивали методом ЛЗХЛ плазмы крови до операции и через 24 часа после операции. Регистрацию результатов осуществляли на флюориметре/спектрофотометре Cary Eclipse FL1002M003 (Variant, USA) с автоматическим определением максимальной интенсивности свечения (I_{max}), светосуммы хемилюминесценции (S), времени достижения пика ЛЗХЛ (t).

Показатель I_{max} отражает взаимодействие (баланс) между компонентами про-/антиоксидантной системы, рассчитывается по формуле (1):

$$((I_{maxk} - I_{maxo}) / I_{maxk}) \times 100\%, \quad (1)$$

где I_{maxk} – интенсивность свечения ЛЗХЛ контрольной смеси;

I_{maxo} – интенсивность свечения ЛЗХЛ исследуемого материала (плазмы).

Результат выражается в процентах относительно контроля.

Показатель *S* отражает состояние мощности антиоксидантной защиты организма, рассчитывается по формуле (2):

$$((S_k - S_0) / S_k) \times 100\%, \quad (2)$$

где S_k – светосумма свечения ЛЗХЛ контрольной смеси;
 S_0 – светосумма свечения ЛЗХЛ исследуемого материала (плазмы).
 Результат выражали в процентах относительно контроля.

Показатель *t* оценивает концентрацию и активность антирадикальной составляющей исследуемой биологической жидкости, выражается в минутах.

Полученные данные обработаны с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft, GS-35F-5899H). Нормальность полученных данных определяли, используя тест Shapiro-Wilk's. Количественные параметры представлены в виде медианы (*Me*) и интерквартильного размаха (25-й (*LQ*) – нижний квартиль и 75-й (*UQ*) – верхний квартиль). Был использован непараметрический метод статистического исследования: критерий Wilcoxon (для анализа различий двух зависимых групп по количественному признаку). Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы принимали равным и менее 0,05.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования выявлено, что устойчивость баланса про-/антиоксидантов в плазме крови у реципиентов почечного трансплантата до операции равнялась 41,9 [28,25; 54,15]%, мощность антиоксидантной системы составляла 32,6 [21,1; 54,6]%, а исходная антирадикальная активность равнялась 0,45 [0,38; 1,145] минут. Через 24 часа после трансплантации почки у пациентов этой группы происходило значимое смещение баланса про-/антиоксидантов до 15,35 [8,575; 36,75]% (Wilcoxon test, $p=0,000983$, $z=3,295$), значимое снижение мощности антирадикальной системы до 25,4 [9,15; 39,35]% (Wilcoxon test, $p=0,008905$, $z=2,616$), а также наблюдалась тенденция в снижении антирадикальной активности до 0,43 [0,38; 1,143] минут (Wilcoxon test, $p=0,236$, $z=1,185$) (см. таблицу).

При изучении влияния операционной травмы и анестезиологического пособия у пациентов в группе «Д» выявлено, что значимого изменения со стороны показателей про-/антиоксидантного баланса плазмы крови не выявлено. До операции баланс про-/антиоксидантов у пациентов в группе «Д» был на уровне 57,98 [39,4; 67,6]%, мощность антиоксидантной системы составляла 58,05 [51,5; 77,65]%, а исходная антирадикальная активность равнялась 1,305 [0,435; 2,71] минут. Через 24 часа после оперативного лечения у этих пациентов уровень баланса про-/антиоксидантов равнялся 44,3 [43,8; 54,6]% (Wilcoxon test, $p=0,63$, $z=1,86$), мощность антирадикальной системы оставалась на уровне 57,59 [52,4; 64,1]% (Wilcoxon test, $p=0,94$,

Показатели про-/антиоксидантного баланса плазмы крови пациентов группы «Т» (*Me* [*Q*₂₅; *Q*₇₅])

Показатель	До операции	После операции
<i>I</i> _{max} , %	41,9 [28,25; 54,15]*	15,35 [8,575; 36,75]*
<i>S</i> , %	32,6 [21,1; 54,6]*	25,4 [9,15; 39,35]*
<i>t</i> , мин	0,45 [0,38; 1,145]*	0,43 [0,38; 1,143]*

Примечание: * – значимо по сравнению со значением до операции при $p < 0,05$.

$p=0,078$). Уровень антирадикальной активности также значимо не изменился и составлял 1,09 [0,56; 1,53] минут (Wilcoxon test, $p=0,68$, $z=0,49$).

Значимое снижение интенсивности ЛЗХЛ (I_{max}) в раннем послеоперационном периоде после трансплантации почки свидетельствует об активации процессов свободно-радикального окисления и о развитии недостаточности компонентов антиоксидантной защиты. Данные изменения характеризуют начальную стадию окислительного стресса, в связи с увеличением в крови недоокисленных продуктов метаболизма, накопившихся в ишемизированном аллотрансплантате. В результате реперфузии донорской почки активируется каскад свободнорадикальных процессов, требующих от организма реципиента определенного уровня и активности системы антиоксидантной защиты. Полученные данные указывают на значимое снижение суммарной антиоксидантной активности (S), отражающей степень активности и концентрацию антиоксидантов в плазме крови реципиентов. Это указывает на истощение запасов антиоксидантов и снижение способности реагировать на активацию свободнорадикального окисления. На фоне увеличения количества первичных радикалов уже в течение суток после включения донорской почки в кровоток происходит истощение в организме реципиента антирадикалов, блокирующих их образование. Наблюдаемая тенденция снижения t у пациентов в ранний посттрансплантационный период является тому подтверждением.

Реперфузия донорской почки активирует каскад свободнорадикальных процессов в связи с увеличением в крови недоокисленных продуктов метаболизма, которые накопились в ишемизированном аллотрансплантате. Данные процессы вызывают снижение I_{max} и S в раннем посттрансплантационном периоде, что указывает на преобладание прооксидантов и истощение компонентов антиоксидантной защиты организма с развитием окислительного стресса. В течение 24 часов после операции на фоне роста уровня первичных радикалов отмечается истощение в организме реципиента антирадикалов, блокирующих их. Это подтверждается снижением t у пациентов в ранний посттрансплантационный период.

Отсутствие в послеоперационном периоде значимого изменения в показателях про-/антиоксидантного баланса плазмы крови пациентов, оперированных по поводу послеоперационной вентральной грыжи и ожирения, указывает на минимальное воздействие анестезиологического пособия и операционной травмы на устойчивость баланса. С одной стороны, это можно объяснить высоким уровнем анестезиологической службы, а с другой – компенсаторными механизмами в группе пациентов данного профиля.

■ Выводы

1. Метод ЛЗХЛ плазмы крови может быть использован для определения нарушений показателей про-/антиоксидантного баланса плазмы крови у пациентов в раннем посттрансплантационном периоде.
2. Ишемически-реперфузионное повреждение уже в течение первых суток вызывает истощение компонентов антиоксидантной защиты организма с развитием окислительного стресса.
3. Степень изменения показателей про-/антиоксидантного баланса у реципиентов почечного трансплантата может быть использована для определения тяжести ишемически-реперфузионной травмы, что требует проведения дальнейших исследований.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Pikirenya I., Pirov B., Korotkov S., Kalachik O., Dzyadz'ko A., Rummo O. (2016) Stanovlenie i razvitie transplantacii organov v Respublike Belarus' [Development of organ transplantation in the Republic of Belarus]. *Hirurgiya. Vostochnaya Evropa*, vol. 18, no 2, pp. 258–266.
2. Zul'karnaev A. (2013) Patogeneticheskoe obosnovanie e'fektivnosti e'kstrakorporal'noj terapii pri lechenii reperfuzyonnoj travmy pochechnogo transplantata [Pathogenetic substantiation of the effectiveness of extracorporeal therapy in the treatment of reperfusion injury of renal transplant]. *Vestnik novykh medicinskih tehnologij*, no 1, pp. 50–53.
3. Belyaev A., Mojsyuk Ya., Il'inskiy I. (2000) Klinicheskie aspekty problemy pervichno nefunkcioniruyushhego transplantata pochki [Clinical aspects of primary non-functioning kidney transplant]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*, no 1, pp. 18–25.
4. Treska V., Kobr J., Hasman D., Racek J., Trefil L., Reischig T., Hes O., Kuntscher V., Molacek J., Treska I. (2009) Ischemia-reperfusion injury kidney transplantation from non-heart-beating donor – do antioxidant or anti-inflammatory drugs play any role? *Bratisl Lek Listy*, vol. 110, no 3, pp. 133–136.
5. Vostalova J., Galandakova A., Strebl P., Zadrazil J. (2013) Oxidative stress in patients after kidney transplantation. *Vnitr Lek*, vol. 59, no 4, pp. 296–300.
6. Nikonenko A., Trailin A., Nikonenko T. (2011) Sovremennye metody diagnostiki, prognozirovaniya i profilaktiki disfunkcii pochechnogo allotransplantata [Modern methods of diagnostics, prediction and prevention of dysfunction of the renal allograft]. *Vestnik hirurgii*, vol. 170, no 6, pp. 37–42.
7. Kalachik O., Ugolev I., Zabello T., Sadovskij D., Oganova E., Muravskij V. (2015) Ocenka funkcional'nykh harakteristik al'bmina metodom e'lektronnogo paramagnitnogo rezonansa u pacientov posle transplantacii pochki [Assessment of functional characteristics of serum albumin with the method of electronic paramagnetic resonance in patients after kidney transplantation]. *Vesci nacyyanaŭnaj akademii navuk Belarusi. Seryya medycynskaya navuki*, no 4, pp. 72–77.
8. Nikol'skaya V. (2010) Izmenenie processov oksidatel'noj modifikacii belkov i urovnya molekul srednej massy u bol'nykh s nadpochechnikovoju nedostatochnost'yu, soprovozhdayushhejsya giperinsulinemiej [The change in the processes of oxidative modification of proteins and the level of average weight molecules in patients with adrenal insufficiency, accompanied by hyperinsulinemia]. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V.I. Vernad'skogo Seriya "Biologiya, himiya"*, vol. 23, no 1, pp. 84–90.
9. Vatazin A., Nesterenko I., Zul'karnaev A., Shahev N. (2015) Patogeneticheskie mehanizmy razvitiya ishemicheski-reperfuzyonnogo povrezhdeniya pochki kak perspektivnye mishihi specificheskoy terapii [Pathogenetic mechanisms of ischemia-reperfusion injury of the kidney as a promising target of specific therapy]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*, vol. 27, no 1, pp. 147–156.
10. Zyblov S., Dundarov Z. (2013) Antioksidantnaya aktivnost' krovi bol'nykh s ostrym gastroduodenal'nym krvotocheniem [Antioxidant activity of the blood of patients with acute gastroduodenal bleeding]. *Hirurgiya. Vostochnaya Evropa*, vol. 5, no 1, pp. 12–23.
11. Belyakov N., Semes'ko S. (2005) Antioksidantnaya aktivnost' biologicheskikh zhidkostej cheloveka: metodologiya i klinicheskoe znachenie [Antioxidant activity of human biological fluids: methodology and clinical significance]. *Efferentnaya terapiya*, vol. 11, no 1, pp. 5–21.
12. Izmajlov D., Demin E., Vladimirov Yu. (2011) Opredelenie aktivnosti antioksidantov metodom izmereniya kinetiki hemilyuminescencii [Determination of the activity of antioxidants with measuring the kinetics of chemiluminescence]. *Fotobiologiya i e'ksperimental'naya fotomedicina*, no 2, pp. 70–76.
13. Kolesnikov V., Evseev A., El'kov A., Pinchuk A., Kokov L., Car'kova T., Gol'din M. (2015) Prognozirovaniye razvitiya oslozhnenij posle transplantacii s pomoshh'yu izmereniya redoks-potenciala [Prediction of complications after transplantation with measuring the redox potential]. *Klinicheskaya medicina*, vol. 7, no 4, pp. 84–90.
14. Vladimirov Yu. (2001) Aktivirovannaya hemilyuminescenciya i bioluminescenciya kak instrument v mediko-biologicheskikh issledovaniyah [Activated chemiluminescence and bioluminescence as a tool in biomedical research]. *Saravskij obrazovatel'nyj zhurnal*, vol. 7, no 1, pp. 16–23.

Поступила / Received: 13.02.2017

Контакты / Contacts: szyblev@yandex.by