

Петренко Т.С.<sup>1</sup>, Новикова И.А.<sup>1</sup>, Зыблев С.Л.<sup>1</sup>, Дундаров З.А.<sup>1</sup>, Зыблева С.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

<sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

Petrenko T.<sup>1</sup>, Novikova I.<sup>1</sup>, Zyblev S.<sup>1</sup>, Dundarov Z.<sup>1</sup>, Zybleva S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

<sup>2</sup> Republican Scientific Center of Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

## Состояние про/антиоксидантной системы крови у реципиентов почечного аллотрансплантата

The state of pro/antioxidant system of blood in recipients of renal allograft

### Резюме

В статье отражено состояние про/антиоксидантной системы плазмы крови методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) у 43 пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5 стадии до и через 24 часа после аллотрансплантации почки. С использованием метода люминол-зависимой хемилюминесценции установлено, что до трансплантации почки имеют место выраженные сдвиги про/антиоксидантного равновесия, обусловленные снижением антиоксидантных свойств плазмы крови и повышением содержания веществ с прооксидантными свойствами. После аллотрансплантации почки в 90,7% случаев наблюдается дальнейшее снижение антиоксидантной активности плазмы и повышение содержания прооксидантов. Определение степени и характера сдвигов про/антиоксидантного баланса плазмы крови (возможность которого предоставляется использованием технологии люминол-зависимой хемилюминесценции) может служить инструментом мониторинга реципиентов почечного аллотрансплантата в посттрансплантационном периоде.

**Ключевые слова:** про/антиоксидантный баланс, трансплантация почки.

### Abstract

The article reflects the state of pro/antioxidant system of blood plasma with the method of luminol-dependent chemiluminescence in 43 patients with HBP 5 stages before and in 24 hours after allotransplantation of kidney. Before kidney transplantation, there take place the expressed shifts of pro/antioxidant balance, caused by decrease of antioxidant properties of blood plasma and increase of content of the substances with pro-oxidant properties. After kidney allotransplantation, there is observed further decrease of antioxidant activity of plasma and increase of the content of pro-oxidants in 90.7% of cases.

The obtained results demonstrate that determination of the degree and nature of shifts of pro/antioxidant balance of blood plasma by the LZHL method in recipients of renal allograft can serve as the instrument of their monitoring in the post-transplantation period.

**Keywords:** pro/antioxidant balance, transplantation of kidney.

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Успех хирургического вмешательства при трансплантации почки в значительной степени обусловлен своевременной диагностикой и коррекцией нарушений гомеостаза у реципиента. Для мониторинга посттрансплантационных реакций предложен ряд лабораторных методов, однако «золотым стандартом» контроля процессов, протекающих в трансплантате, остается гистологическое исследование биоптата [1, 2]. В то же время наличие ряда ограничений к применению данного метода обуславливает интерес к разработке новых диагностических подходов, общим принципом которых является «неприкасаемость к трансплантату».

Трансплантация почки сопровождается временным прекращением кровотока в донорском органе, что неизбежно приводит к ишемии органа с последующей реперфузией. Патогенез органных нарушений, возникающих и развивающихся во время ишемии-реперфузии, включает активацию свободнорадикального окисления (СРО), сопровождающуюся накоплением кислородных радикалов, стимуляцией перекисного окисления липидов (ПОЛ) с последующим изменением структуры и функции клеточных мембран, а также компенсаторной активацией антиоксидантных систем [3–5]. Нарушение баланса между интенсивностью прооксидантных и антиоксидантных процессов может приводить к усугублению патологических изменений, поэтому рассматривается как потенциальный лабораторный критерий для мониторинга течения заболевания и контроля эффективности лечения у пациентов с различными патологическими состояниями, в т.ч. и реципиентов почечного трансплантата [6, 8–10].

Наличие антиоксидантных свойств продемонстрировано в настоящее время у большого количества различных эндогенных веществ – ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза), витаминов, церулоплазмينا и др. Ряд из них, например, мочевая кислота, мочевины, витамин С могут проявлять двойные свойства (про- либо антиоксидантные), в зависимости от различных условий [7, 9, 11–13]. В связи с многокомпонентностью про/антиоксидантной системы определение отдельных ее показателей не позволяет решить вопрос, носят ли выявляемые сдвиги компенсаторный характер или являются отражением оксидативного стресса, т.е. оценить, идет ли речь о балансе или о дисбалансе редокс-системы [8, 9, 11, 12]. Данный недостаток успешно преодолевается за счет интегральной оценки состояния про/антиоксидантной системы методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) [13].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить в динамике наблюдения состояние про/антиоксидантного баланса крови у реципиентов аллотрансплантированной почки.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 43 пациента с хронической болезнью почек (ХБП) 5-й (терминальной) стадии, поступивших в отделение трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии ГУ «Республиканский

научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ») для проведения аллотрансплантации почки. Возраст пациентов составлял от 28 до 62 лет, из них 20 мужчин и 23 женщины. Клиническое исследование проведено с информированного согласия пациентов и одобрено комитетом по этике ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ». В контрольную группу вошел 41 практически здоровый человек, сопоставимый по полу и возрасту.

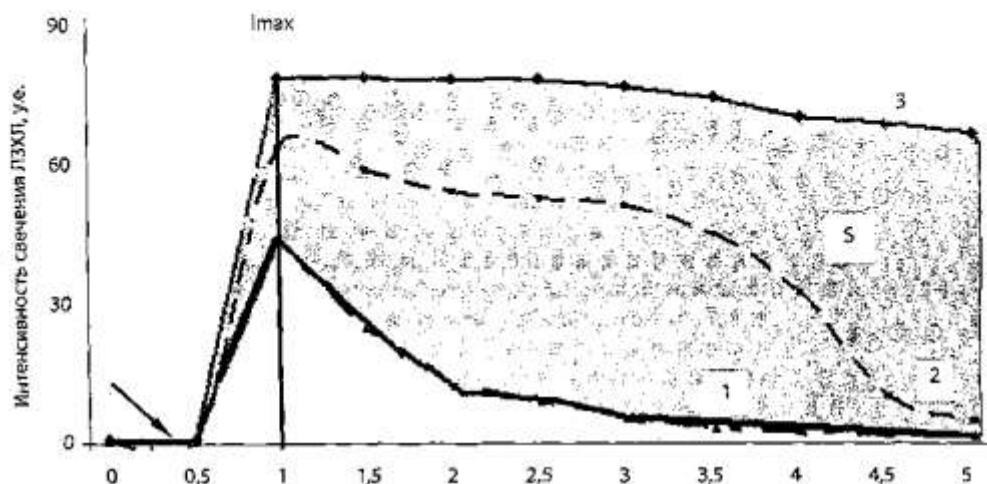
Лабораторные исследования выполняли на базе лаборатории клеточных технологий ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ». Кроме общепринятого клинко-лабораторного обследования пациентам проводили оценку состояния про/антиоксидантного баланса плазмы крови методом люминол-зависимой хемилюминесценции до трансплантации почки и через 24 часа после операции. С целью стандартизации методики использовали подход, основанный на сравнении интенсивности ЛЗХЛ-радикалообразующей системы в отсутствие и в присутствии биологического материала [14]. Радикалообразующая смесь готовилась *extempore* и состояла из 1 мл раствора трис-буфера (pH=8,8), 0,1 мл 25 ммоль/л раствора сернокислого железа и 0,1 мл 0,1 г/л раствора люминола. В приготовленную смесь вносили 0,1 мл физиологического раствора (контроль) либо такой же объем биологического материала (опыт). Процесс СРО «запускали» добавлением 0,1 мл 30 г/л (3%) раствора перекиси водорода. Регистрацию результатов ЛЗХЛ осуществляли в течение 5 минут на флюориметре/спектрофотометре Cary Eclipse FL1002M003 (Varian, USA) с автоматическим определением максимальной интенсивности свечения ( $I_{max}$ ), светосуммы хемилюминесценции ( $S$ ). Результаты исследования представляли в процентах как степень подавления ЛЗХЛ-радикалообразующей смеси в присутствии биологического материала по сравнению с контролем. Дополнительно рассчитывали соотношение  $I_{max}/S$  как показатель антиокислительного потенциала [12].

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft, GS-35F-5899H). Нормальность распределения полученных данных определяли, используя тест Шапиро – Уилка. Так как результаты не подчинялись нормальному закону распределения, использовали непараметрические методы статистического анализа. 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 критерий Уилкоксона, для независимых групп – критерий U Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типичные кривые хемилюминесценции радикалообразующей смеси в отсутствие и в присутствии плазмы крови представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, добавление плазмы крови здоровых лиц значительно подавляет ЛЗХЛ-радикалообразующей смеси (кривая 1). При этом снижение значений  $I_{max}$  обеспечивается в наибольшей степени антиоксидантными свойствами плазмы, а угнетение значений  $S$  демонстрирует способность плазмы блокировать продолжающееся радикалообразование, которое обеспечивается прооксидантами,



**Рис. 1.** Типичные кривые люминил-зависимой хемилюминесценции и определяемые параметры

Примечание: кривые ЛЗХЛ плазмы здоровых лиц (1), пациентов с ХБП (2), радикалообразующей смеси (3, контроль); стрелкой указан момент внесения в радикалообразующую смесь 3%-го раствора перекиси водорода; заливкой обозначены определяемые нами параметры ЛЗХЛ.

присутствующими в плазме, а также радикалами в радикалообразующей смеси [9, 12, 13]. Таким образом, выраженное подавление ЛЗХЛ-радикалообразующей смеси (кривая 1) свидетельствует об устойчивом равновесии между про- и антиоксидантами. Недостаточная антиоксидантная активность плазмы проявляется снижением степени угнетения  $I_{max}$  (кривая 2), а если, в дополнение к этому, имеет место избыточное накопление прооксидантов, наблюдается дополнительно снижение степени угнетения  $S$  (кривая 2).

Показатели ЛЗХЛ плазмы крови пациентов с аллотрансплантированной почкой до и после трансплантации представлены в табл. 1.

**Таблица 1**  
Показатели про/антиоксидантной системы плазмы крови

Показатель	Здоровые лица, n=41	Пациенты, n=43	
		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]**
$I_{max}/S$	1,1 [0,8; 1,3]	1,2 [0,9; 2,0]*	1,2 [0,8; 1,6]

Примечания:  $I_{max}$  и  $S$  представлены как степень подавления ЛЗХЛ-радикалообразующей смеси при добавлении плазмы крови; результат представлен в виде Me (25%; 75%).

\* Различия значимы в сравнении со здоровыми лицами при  $p < 0,05$  (U-критерий Манна – Уитни);

\*\* Различия значимы в сравнении со значением до операции при  $p < 0,05$  (критерий Уилкоксона).

Как видно из табл. 1, у всех пациентов в дооперационном периоде наблюдалось уменьшение относительных значений  $I_{\max}$  и  $S$  по сравнению со здоровыми лицами ( $p=0,003$  и  $p=0,001$  соответственно), что указывает на исходную недостаточность антиоксидантной активности плазмы ( $I_{\max}$ ) и снижение общей емкости про/антиоксидантной системы за счет повышения количества прооксидантов ( $S$ ). Учитывая, что все обследованные пациенты имели ХБП 5-й стадии, данные изменения, возможно, связаны с наличием уремической интоксикации [2, 3, 5, 6]. Через 24 часа после операции происходило дальнейшее снижение показателей  $I_{\max}$  (в 2,6 раза,  $p=0,022$ ) и несколько в меньшей степени  $S$  (в 1,5 раза,  $p=0,028$ ). При этом индекс соотношения  $I_{\max}/S$  в дооперационном периоде превышал значения здоровых лиц ( $p=0,028$ ), а в послеоперационном периоде не отличался от контрольной группы. Это свидетельствует о том, что у пациентов с ХБП до трансплантации изменение проантиоксидантного равновесия в большей мере обусловлено накоплением прооксидантов, а в послеоперационном периоде – недостаточностью антиоксидантного звена.

При анализе полученного материала обратило на себя внимание то обстоятельство, что способность плазмы пациентов подавлять ЛЗХЛ варьировала в широких пределах – от 5,6 до 88,7%; это послужило основанием для анализа показателей ЛЗХЛ в группах пациентов, разделенных по значениям  $I_{\max}$  (рис. 2). В качестве точек отсечения были выбраны значения 5-го и 25-го перцентилей здоровых лиц (43,9% и 71,9% соответственно). В 1-ю группу вошли 15 пациентов с исходными значениями  $I_{\max}$  плазмы  $\leq 43,9\%$ , в группу 2 ( $n=20$ ) – со значениями  $I_{\max}$

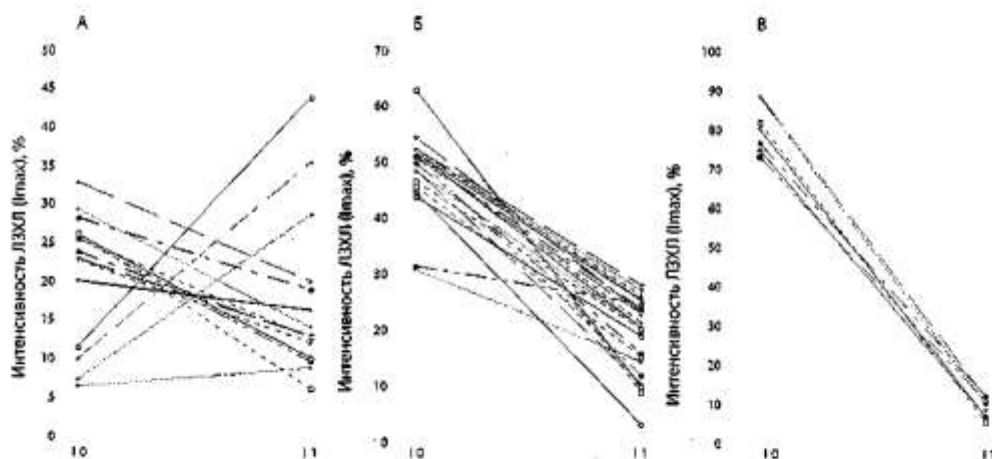


Рис. 2. Индивидуальная динамика показателей  $I_{\max}$  плазмы крови у пациентов с ХБП в зависимости от исходного уровня  $I_{\max}$

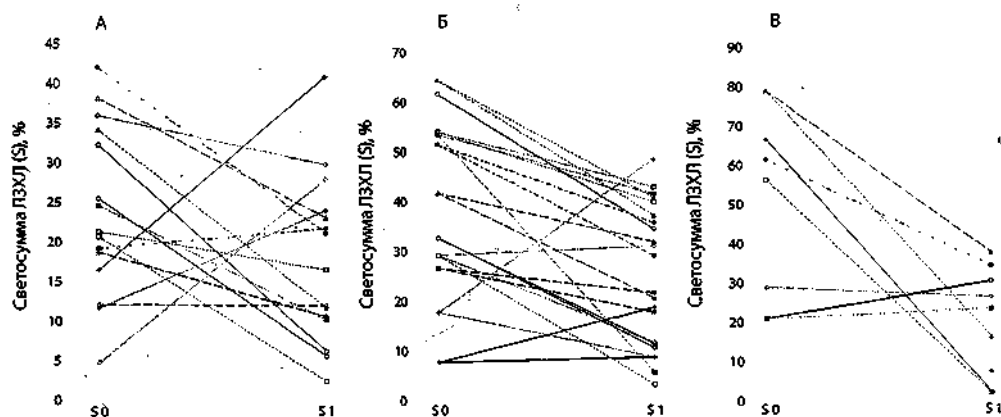
Примечание: А – пациенты 1-й группы; Б – пациенты 2-й группы; В – пациенты 3-й группы; по оси ординат – степень угнетения интенсивности свечения в %;  $I_0$  – показатель  $I_{\max}$  плазмы до трансплантации почки;  $I_1$  – показатель  $I_{\max}$  плазмы крови после трансплантации почки.

в диапазоне 44,0–71,9%; в 3-ю группу (n=8) – пациенты со значениями  $I_{\max} \geq 72,0\%$ . Пациенты всех групп были сопоставимы по полу и возрасту.

Как видно из рис. 2А, у пациентов первой группы с изначально низким уровнем  $I_{\max}$  плазмы крови после трансплантации почки наблюдались разнонаправленные изменения интенсивности ЛЗХЛ: у 11 пациентов отмечалось снижение  $I_{\max}$  плазмы, в одном случае изменения отсутствовали, а у 3-х пациентов значения  $I_{\max}$  плазмы повысились. Каких-либо клинико-лабораторных особенностей у этих пациентов нами не отмечено. У пациентов 2-й и 3-й групп параметры  $I_{\max}$  через 24 часа после трансплантации почки снизились (в 2,5 раза,  $p < 0,001$ ; в 8,9 раз,  $p = 0,012$  соответственно), причем значения интенсивности ХЛ в дооперационный и послеоперационный периоды колебались в небольшом диапазоне. Уменьшение способности плазмы подавлять ЛЗХЛ-радикалообразующей смеси (снижение относительных значений  $I_{\max}$ ) является, по-видимому, следствием снижения резерва антиоксидантной активности за счет недостаточной (сравнительно с темпом накопления прооксидантов) активации антиоксидантной системы у пациентов в раннем посттрансплантационном периоде.

Значения емкости про/антиоксидантной системы (S) в этих же группах пациентов характеризовались значительной разнонаправленностью изменений (рис. 3), хотя в большинстве случаев (у 34 реципиентов – 79%) наблюдалось снижение значений показателя.

У ранее описанных нами пациентов (3 человека) с инверсной реакцией про/антиоксидантной системы в виде повышения  $I_{\max}$  численные значения параметров ЛЗХЛ были следующими: до трансплантации  $I_{\max} = 7,3\%$ ; 9,9% и 11,4%, значения S у этих же пациентов – 11,7; 12,1% и 32,3%.



**Рис. 3. Индивидуальная динамика показателей S плазмы крови у пациентов с ХБП в зависимости от исходного уровня  $I_{\max}$**

Примечание: А – пациенты 1-й группы; Б – пациенты 2-й группы; В – пациенты 3-й группы; на оси ординат – степень угнетения светосуммы (S) в %;  $S_0$  – показатель S плазмы до трансплантации почки;  $S_1$  – показатель S плазмы крови после трансплантации почки.

В раннем послеоперационном периоде относительные значения  $I_{\max}$  составили 28,6%; 35,4%; 43,8%, тогда как значения  $S$  – 23,9%; 21,9% и 16,1% соответственно. Антиоксидантный потенциал ( $I_{\max}/S$ ) плазмы крови у данных пациентов до пересадки почки составил 0,62; 0,82; 0,35, после операции – 1,21; 1,62; 2,72, что подтверждает выраженную активацию компонентов антиоксидантной защиты. Таким образом, расчет соотношения  $I_{\max}/S$  дает дополнительную информацию о динамике восстановления равновесия про/антиоксидантной системы.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что определение степени и характера сдвигов про/антиоксидантного баланса плазмы крови методом ЛЗХЛу реципиентов почечного аллотрансплантата может служить инструментом их мониторинга в посттрансплантационном периоде, во многом способствуя решению вопроса о целесообразности назначения средств с антиоксидантной активностью.

### ■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов с хронической болезнью почек 5-й стадии отмечаются выраженные сдвиги про/антиоксидантного равновесия, обусловленные снижением антиоксидантных свойств плазмы крови (в сравнении со здоровыми лицами,  $p=0,003$ ), но в большей степени – повышением содержания веществ с прооксидантными свойствами (в сравнении со здоровыми лицами,  $p=0,001$ ). При этом индекс  $I_{\max}/S$  у реципиентов почечного трансплантата был выше, чем у здоровых лиц ( $p=0,028$ ).
2. Через 24 часа после аллотрансплантации почки в 90,7% случаев наблюдается дальнейшее снижение антиоксидантной активности плазмы крови ( $p=0,022$  в сравнении с дооперационным периодом) и в большей степени – повышение содержания прооксидантов ( $p=0,028$  в сравнении с уровнем до операции). Соотношение  $I_{\max}/S$  у пациентов после аллотрансплантации не отличалось от контрольной группы.
3. У пациентов после «включения» почечного аллотрансплантата в общий кровоток обнаружены различия по характеру сдвигов про/антиоксидантного равновесия в плазме крови, что открывает перспективы использования показателей  $I_{\max}$ ,  $S$  и соотношения  $I_{\max}/S$  в мониторинге посттрансплантационного периода.

---

### ■ ЛИТЕРАТУРА

1. Pervakova E.H., Aleksandrova I., Balkarov A. (2011) Vybor metoda zamestitel'noj pochechnoj terapii u bol'nyh s otsrochennoj funkciej transplantata pochki v rannem posleoperacionnom periode [The choice of the method of replacement renal therapy in patients with the delayed function of a transplant of the kidney in the early postoperative period]. *Transplantology*, no 3, pp. 5–15.

2. Nikonenko A., Trajlin A., Nikonenko T. (2011) Sovremennyye metody diagnostiki, prognozirovaniya i profilaktiki disfunkcii pochechnogo allotransplantata [Modern methods of diagnostics, prediction and prevention of dysfunction of renal allograft]. *Vestnik hirurgii*, no 6, pp. 37–42.
3. Zul'karnaev A. (2013) Patogeneticheskoe obosnovanie éffektivnosti e'kstrakorporal'noj terapii pri lechenii reperfuzionnoj travmy pochechnogo transplantata [Pathogenetic substantiation of the effectiveness of extracorporeal therapy in the treatment of reperfusion injury of renal transplant]. *Vestnik novykh medicinskih tekhnologij*, no 1, pp. 50–53.
4. Treska V. (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., Strelbi P., Zadrzil J. (2013) Oxidative stress in patients after kidney transplantation. *Vnitri Lek*, vol. 59, no 4, pp. 296–300.
6. Vatazin A., Nesterenko I., Zulkarnaev A., SHashov N. (2015) Patogeneticheskie mekhanizmy razvitiya ishemiicheski-reperfuzionnogo porazheniya pochki kak perspektivnyye misheni specificheskoy terapii [Pathogenetic mechanisms of development of ischemic-reperfusion lesion of the kidney as perspective targets of specific therapy]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*, vol. 27, no 1, pp. 147–156.
7. Zyblev S. (2016) Rol' mochevoj kisloty v sisteme antioksidantnoj zashchity organizma [The role of uric acid in the system of antioxidant protection of the organism]. *Problems of health and ecology*, no 1 (47), pp. 50–55.
8. Kamyshnikov V. (2014) Metabolicheskie faktory formirovaniya patologicheskikh sostoyanij, svyazannykh s narusheniem antioksidantnogo statusa organizma: metody ocenki [Metabolic factors of formation of pathological states connected with violations of antioxidant status of the organism: assessment methods]. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*, no 3 (11), pp. 116–133.
9. Vladimirov YU. (2001) Aktivirovannaya hemilyuminescenciya i biolyuminescenciya kak instrument v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh [The activated chemoluminescence and bioluminescence as a tool in medical-biological research]. *Sorovskij obrazovatel'nyj zhurnal*, vol. 7, no 1, pp. 16–23.
10. Shepelev A. (2000) Rol' processov svobodnoradikal'nogo okisleniya v patogeneze infekcionnykh boleznej [The role of the processes of free-radical oxidation in pathogenesis of infectious diseases]. *Voprosy medicinskoj himii*, vol. 46, no 2, pp. 110–116.
11. Izmajlov D., Demin E., Vladimirov YU. (2011) Opredelenie aktivnosti antioksidantov metodom izmereniya kinetiki hemilyuminescencii [Determination of activity of antioxidants with the method of measurement of the kinetics of chemoluminescence]. *Fotobiologiya i ehksperimental'naya fotomedicina*, no 2, pp. 70–76.
12. Klebanov G. (1999) Antloksidantnaya aktivnost' syvorotki krovi [Antioxidant activity of blood serum]. *Vestnik Ross. Akad. med. Nauk*, no 2, pp. 15–22.
13. Belyakov N., Semes'ko S. (2005) Antioksidantnaya aktivnost' biologicheskikh zhidkostej cheloveka: metodologiya i klinicheskoe znachenie [Antioxidant activity of biological liquids of the human: methodology and clinical significance]. *Efferentnaya terapiya*, vol. 11, no 1, pp. 5–21.
14. Petrenko T., Novikova I., Gomolyako A. (2012) Metodologicheskie podhody k ocenke hemilyuminescencii plazmy krovi. Proceedings of the *Chernobyl'skie chteniya – 2012 (Gomel, Republic of Belarus; April 19-20, 2012)* (eds. A. Rozhko), Gomel: GU "Republican Scientific and Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology", pp. 214–217.

Поступила/Received: 12.04.2017

Контакты/Contacts: Petrenko\_TS@mail.ru