

□ Оригинальные научные публикации

Д. Н. Садовский¹, В. В. Кирковский², Г. Н. Бычко²,
Г. В. Жук¹, О. В. Калачик¹

ПРОТЕИНАЗО-ИНГИБИТОРНАЯ СИСТЕМА ПЛАЗМЫ КРОВИ И УРОВЕНЬ ЭНДОТОКСИНОВ ГРУППЫ «СРЕДНИХ МОЛЕКУЛ» У ДОНОРОВ ПОЧЕК СО СМЕРТЬЮ МОЗГА

УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска¹,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»²

Представлены результаты изучения проб венозной крови из кубитальной и почечной вены у доноров со смертью мозга на этапе эксплантации органов. Исследовано состояние протеиназо-ингибиторной системы и уровень пептидов группы «средних молекул» как интегральный показатель степени эндотоксемии. На основе полученных данных определялись новые предикторы начальной дисфункции трансплантата почки. Выявлено, что в крови, оттекающей от почки на этапе эксплантации органов значения трипсиноподобной активности выше верхней границы нормы при дисфункции трансплантата, что можно использовать в качестве дополнительного предиктора развития ранней дисфункции почечного трансплантата.

Ключевые слова: трансплантация почки, пептиды группы «средние молекулы», отсроченная функция трансплантата, протеиназо-ингибиторная система, протеолитическая активность, ингибиторы протеолиза.

**D. N. Sadouski, V. V. Kirkovsky, G. N. Bychko,
G. V. Zhuk, A. V. Kalachyk**

PLASMA PROTEASE INHIBITOR SYSTEM AND THE LEVEL OF «MIDDLE MOLECULES» GROUP ENDOTOXINS AT KIDNEY'S DONORS AFTER BRAIN DEATH

The results of cubital and renal vein blood samples studying from donors with brain death at the stage of organ's explantation are presented. The condition of protease inhibitor system and the level of «middle molecules» group peptides where investigated as integral rate of endotoxemia. Based on the received data new predictor of early dysfunction of a kidney's transplant defined. It is revealed that the value of trypsin-like activity is higher than the top border normal value at the stage of organ's explantation in the blood flowing from the kidney, which is possible to use as an additional predictor of early kidney's transplant dysfunction.

Key words: kidney transplantation, Middle molecules, delayed graft function, proteinase-inhibitory system, proteolytic activity, inhibitors of proteolysis.

Возникновение в раннем послеоперационном периоде отсроченной функции почечного трансплантата (ОФТ) от доноров со смертью мозга приводит к снижению выживаемости в долгосрочной перспективе трансплантированной почки [10]. К основным причинам возникновения ОФТ относят ишемическое повреждение трансплантата приводящие к развитию острого канальцевого некроза (ОКН) [6]. Ключевая роль в повреждении клеточных мембран и гибели клеток эпителия почечных канальцев, лежащих в основе ОКН принадлежит сочетанному взаимодействию продуктов патологически активированных процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6] и пептидов группы «средних молекул» (СМ) образующихся в организме при гиперактивации плазменного протеолиза

на фоне редукции ингибиторного звена протеолитической системы [1].

Существуют сведения, о том, что при различных формах инсульта, черепно-мозговой травме, нефропатиях различного генеза и острой почечной недостаточности происходит повышение уровня пептидов СМ [1, 3, 8]. У доноров почек со смертью мозга от различных причин состояние протеиназо-ингибиторного баланса, уровня пептидемии и их влияние на детоксикационную функцию почки по утилизации (метаболизации) пептидных фракций в настоящее время не изучено. Не известно также и влияние этих показателей на последующую функцию почечного аллографта. Целью данной работы явилось исследование состояния протеиназо-ингибиторной системы и уровня

пептидов группы СМ у доноров почек со смертью мозга в плазме венозной периферической крови и крови оттекающей от почки и сравнение полученных данных в зависимости от функции почечного трансплантата.

Материал и методы. В исследование включено 44 умерших доноров с констатированной смертью мозга. Во время операции по эксплантации органов проводили одновременный забор крови из кубитальной вены (проба № 1) и из левой почечной вены (проба № 2) по разработанной методике [4] или аналогично из правой почечной вены. Для перфузии и консервации почек применялся охлажденный раствор «Кустодиол» производства компании «Dr. F. Köhler Chemie» Bensheim, Германия. Изъятие органов и «back-table» проводилось по стандартной методике с перфузией органов «in situ».

Определение трипсиноподобной активности (ТпА) и ингибиторного потенциала по уровню α_1 -антитрипсина (α_1 – АТ), α_2 -макроглобулина (α_2 – МГ) в плазме крови проводили по гидролизу синтетического хромогенного субстрата ВАРНА (N^α-, бензоил-DL-аргинил-пара-нитроанилид) [2]. Концентрацию маркеров эндогенной интоксикации – пептидов группы СМ контролировали по методу [5].

Проведен сравнительный анализ показателей проб № 1 и № 2 венозной крови на этапе эксплантации (забора) органов для определения разницы в значениях в зависимости от места взятия пробы. Также проведен сравнительный анализ показателей проб № 1 и № 2 венозной крови на этапе эксплантации в зависимости от последующей функции трансплантата в двух группах реципиентов: с удовлетворительной первичной функцией и отсроченной (ОФТ), замедленной функцией почечного трансплантата (ЗФТ) для определения предиктора последующей функции трансплантата.

В исследование включены только реципиенты, которым трансплантация почки была выполнена в УЗ «9 ГКБ» г. Минска. В зависимости от начальной функции после трансплантации почки реципиенты были разделены на две группы. В группе № 1 (n = 29) была удовлетворительная первичная функция трансплантата. В группе № 2 (n = 23) установлено 6 эпизодов ЗФТ и 17 эпизодов ОФТ почки. Дисфункция аллографта почки диагностировалась при наличии в послеоперационном пе-

риоде замедленной (уровень креатинина крови более 300 мкмоль/л через 7 дней после операции) и/или отсроченной (потребность в 1-м и более сеансах гемодиализа в послеоперационном периоде трансплантации) функции трансплантата. первичная удовлетворительная функция трансплантата почки устанавливалась выделением мочи с первого дня после операции в количестве, достаточном для поддержания удовлетворительного гомеостаза пациентов. Функциональные различия трансплантата почки в группах подтверждались достоверными различиями показателей neutrophil gelatinase-associated lipocalin в моче реципиентов (uNGAL) и уровнем креатинина на 7 сутки после операции (ПОС 7). В частности, медиана uNGAL в первой группе и группе № 2 составила, соответственно, 214,7(92,2;282,3) нг/мл, и 645,7(338;925,4) нг/мл, (p = 0,0017). Медиана креатинина на ПОС 7 составила при удовлетворительной начальной функции 133(96;171) мкмоль/л, и 516,5(321;657) мкмоль/л при дисфункции (p < 0,0001). До трансплантации реципиенты почек находились на хроническом гемодиализе (ГД) или на перитонеальном диализе (ПД)

При сравнении значений медиан электролитов: K⁺, Na⁺ и pH у доноров перед эксплантацией органов в группах статистически значимых различий не выявлено. Так значения K⁺ (ммоль/л) в группе №1 составили 3,9(3,67;4,6) в группе №2 – 4,25(3,8;4,9), (p = 0,296); Na⁺ (ммоль/л) в группе №1 – 144(139;150,9), в группе №2 – 144,5(137;151), (p = 0,88); pH в группе №1 – 7,315(7,27;7,4), в группе №2 – 7,38(7,3;7,42), (p = 0,153).

В группах сравнения средний возраст реципиентов почки, основной диагноз, тип диализотерапии, длительность нахождения на диализотерапии до трансплантации (ДДТ) достоверно не различались (таблица 1).

Время (мин) консервации почечного трансплантата не различалось: в группе № 1 – 555(480;720) и первичная функция – 510(450; 550), (p = 0,15).

Операция аллотрансплантации почки выполнялась по стандартной методике гетеротопической трансплантации. Иммуносупрессивная терапия проводилась по трехкомпонентной схеме (ингибиторы кальциневрина, мофетила микофенолат и глюкокортикостероиды). Средние величины показаны как медиана с 25% и 75% квартильным интервалом – Ме (25;75). Сравнение количественных величин выполнялось с использованием

Таблица 1. Нозологические формы, вид и длительность диализотерапии в группах реципиентов в зависимости от функции трансплантата

Характеристики реципиентов	Группа 1, n = 29	Группа 2, n = 23	p
Средний возраст, лет	38(30;48)	43,5(35;53)	0,135**
ДДТ, мес.	25(13;48)	36(24;60)	0,215**
ПД/ГД, n (%)	5/24(17,24/82,76)	3/20(13,04/86,96)	0,49*
Сахарный диабет, n (%)	0	2(8,69)	0,19*
Подагра, n (%)	0	1(4,35)	0,44*
Поликистоз, n (%)	4(13,8)	5(21,74)	0,34*
Ревматоидный артрит, n (%)	1(3,45)	0	0,55*
Врожденная аномалия мочевыводящих путей, n (%)	3(10,34)	0	0,16*
Хронический гломерулонефрит, n (%)	21(72,41)	15(65,22)	0,4*

Примечание: ** – критерий Манна-Уитни, * – двухсторонний вариант точного критерия Фишера.

Оригинальные научные публикации

Mann-Whitney и Fisher-тестов, при значениях $p < 0,05$ результаты считались статистически достоверными.

Результаты и обсуждение. Установлено, что у доноров со смертью мозга в венозной крови значения медиан ТпА, α_1 АТ, α_2 МГ не выходили за верхнюю границу референтных значений, но в пробе из почечной вены были выше, однако, статистически значимых различий не выявлено. Референтные значения для ТпА: 12–67 нМ/с·л; α_1 АТ: 3–7 нМ/с·л; α_2 МГ: 0,7–1,1 нМ/с·л. Значения медиан СМ оказались выше референтных (0,35 г/л) более чем в 4 раза в периферической венозной крови, а в крови, оттекающей от почки почти в 5 раз. Выявлены статистически значимые различия в значениях в пробах (таблица 2).

Таблица 2. Значения показателей (Ме (25;75)) протеиназо-ингибиторной системы и уровня пептидов группы СМ венозной крови у доноров почек в зависимости от места взятия проб

Показатели	Проба № 1	Проба № 2	p
ТпА, нМ/с·л	43,4(23,7; 94,7)	55,2(35,6; 94,7)	0,295
α_1 АТ, мкМ/с·л	4,3(2,5; 8,8)	5,05(2,7; 11,1)	0,29
α_2 МГ, мкМ/с·л	0,995(0,7; 1,3)	1(0,77; 1,3)	0,87
ПСММ, г/л	1,49(1,16; 1,88)	1,74(1,4; 2,15)	0,02

При сравнении исследуемых показателей в зависимости от функции аллогraftа в раннем послеоперационном периоде определено, что при первичной удовлетворительной функции трансплантата не выявлено превышения верхних границ нормы ТпА, α_1 АТ, α_2 МГ кроме показателя уровня СМ, но достоверных различий в значениях исследуемых величин в зависимости от места взятия пробы не выявлено (таблица 3).

Таблица 3. Значения показателей (Ме (25;75)) протеиназо-ингибиторной системы и уровня пептидов группы СМ венозной крови у доноров почек с удовлетворительной функцией в зависимости от места взятия проб

Показатели	Проба № 1	Проба № 2	p
ТпА, нМ/с·л	39,5(23,7; 82,85)	43,45 (31,6; 71)	0,877
α_1 АТ, мкМ/с·л	4,6(2,65; 8)	7(3,2; 11,4)	0,24
α_2 МГ, мкМ/с·л	0,99(0,74; 1,315)	0,97(0,77; 1,3)	0,97
ПСММ, г/л	1,42(1,16; 1,97)	1,74(1,4; 2,06)	0,12

При дисфункции трансплантата выявлена тенденция к различию в значениях пептидов группы СМ в зависимости от места взятия пробы: их больше в почечной крови ($p = 0,07$) и **повышенный уровень ТпА в почечной пробе**, но статистически значимых различий не выявлено (таблица 4).

Не выявлено различий в значениях показателей в периферической крови при сравнении 1 и 2 групп. Также не выявлено превышения верхних границ нормы кроме показателя СМ (таблица 5).

В группе с удовлетворительной функцией органа уровень ТпА в крови из почечной вены оставался в пределах нормы (до 67 нМ/с·л). В группе с дисфункцией уровень ТпА был в 1,6 раза выше, чем в первой группе, и составил 71(47,3; 110,5) нМ/с·л (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,027$). Значения α_1 АТ выше верхней грани-

Таблица 4. Значения показателей (Ме (25;75)) протеиназо-ингибиторной системы и уровня пептидов группы СМ венозной крови у доноров почек с отсроченной функцией в зависимости от места взятия проб

Показатели	Проба № 1	Проба № 2	p
ТпА, нМ/с·л	51,25(23,7;110,5)	71(47,3;110,5)	0,27
α_1 АТ, мкМ/с·л	3,15(2,5;9,2)	4,22(2,3;7,5)	0,6
α_2 МГ, мкМ/с·л	0,99(2,3;7,5)	1,035(0,6;1,3)	1
ПСММ, г/л	1,54(1,02;1,83)	1,78(1,4;2,155)	0,07

Таблица 5. Значения показателей (Ме (25;75)) протеиназо-ингибиторной системы и уровня пептидов группы СМ в периферической венозной крови у доноров почек в зависимости от функции трансплантата

Показатели	Группа 1	Группа 2	p
ТпА, нМ/с·л	39,5(23,7;82,85)	51,25(23,7;110,5)	0,7
α_1 АТ, мкМ/с·л	4,6(2,65;8)	3,15(2,5;9,2)	0,83
α_2 МГ, мкМ/с·л	0,99(0,74;1,315)	0,985(2,3;7,5)	0,58
ПСММ, г/л	1,42(1,16;1,97)	1,545(1,02;1,83)	0,67

цы нормы и выше в сравнении с группой № 2, также выше референтных границ значения СМ, но достоверных различий не выявлено (таблица 6).

ROC-анализ полученных данных позволил определить, что превышение порогового значения трипсиноподобной активности в 82,85 нМ/с·л ассоциировано с отсроченной и замедленной функцией почечного трансплантата в 82% случаев.

Значения α_1 АТ выше верхней границы нормы и выше в сравнении с группой № 2, также выше референтных границ значения СМ, но достоверных различий не выявлено (таблица 6).

Таблица 6. Значения показателей (Ме (25;75)) протеиназо-ингибиторной системы и уровня пептидов группы СМ в венозной крови, оттекающей от почки доноров почек в зависимости от функции трансплантата

Показатели	Группа 1	Группа 2	p
ТпА, нМ/с·л	43,45(31,6; 71)	71(47,3;110,5)	0,027
α_1 АТ, мкМ/с·л	7(3,2;11,4)	4,22(2,3;7,5)	0,247
α_2 МГ, мкМ/с·л	0,97(0,77;1,3)	1,035(0,6;1,3)	0,982
ПСММ, г/л	1,74(1,4;2,06)	1,785(1,4;2,155)	0,764

Известно, что у пациентов с травмой головного мозга, особенно тяжелой степени тканевая гипоксия через активацию процессов ПОЛ и накопления в аномальных количествах продуктов перекисидации повреждает функцию цитоплазматических мембран вплоть до их деструкции. Это в свою очередь способствует выходу лизосомальных ферментов во внеклеточную среду, а затем и в систему гемодинамики, тем самым, активируя каскады экстрацеллюлярных систем протеолиза. При недостаточной функциональной активности ингибиторного звена нарушается динамическое равновесие между активностью эндогенных протеиназ и уровнем их естественных ингибиторов, что при-

водит к развитию стойкой и выраженной про- и/или гиперпротеаземии. Следствием развивающихся патобиохимических реакций является сдвиг белкового обмена в сторону усиления катаболизма и избыточного накопления промежуточных продуктов протеолиза белков – пептидов группы СМ, так их высокий уровень обнаруживается у больных с почечной недостаточностью различной степени [8, 9], а активность β_2 М при выписке после трансплантации используется в качестве биомаркера выживаемости пациента и трансплантата [7]. В нашем исследовании выявлен повышенный уровень пептидов группы СМ в венозной крови, взятой во время операции по эксплантации органов у доноров со смертью мозга. Уровень пептидов группы СМ превышал почти в 4 раза показатели здоровых людей в периферической венозной, а в крови, оттекающей от почки в 5 раз. Значения медиан СМ в 1,49 г/л в периферической крови и 1,74 г/л в крови, оттекающей от почки выше референтных значений, но не превышают уровня пептидов группы СМ при хронических заболеваниях почек (ХБП) в терминальной стадии и острой почечной недостаточности (ОПН). Так в исследовании [3] значения СМ были при ОПН – 3,7 г/л, а при ХБП – 2,97 г/л.

Причиной разницы между пробами венозной крови может служить, по нашему предположению, повреждение щеточного эпителия проксимального канальца гидрофобной фракцией СМ, после чего нарушается нормальная работа проксимального отдела нефрона. Но, к сожалению, мы не исследовали артериальную кровь, которая попадает в почку по уровню пептидемии. После проведенного сравнительного анализа в группах реципиентов с ОФТ и начальной удолетворительной функцией почечного трансплантата мы не выявили статистически значимых различий в уровне пептидов группы СМ в пробах венозной крови из кубитальной и почечной вены. При изучении состояния протеиназо-ингибиторной системы в венозной крови установлено, что уровень ТпА выше верхней границы нормы при дисфункции трансплантата и только в крови, оттекающей от почки, что, возможно связано с повреждением щеточной каемки гидрофобным пептидными фракциями СМ. Уровни ингибиторов протеолитических ферментов не отличаются в зависимости от места взятия проб крови и от функции трансплантата почки, но определяется высокое значение, близкое к верхней границе нормы, что отражает пропорциональное увеличение активности ингибиторов на активацию протеолиза на фоне увеличенного содержания в крови пептидов группы СМ.

Выводы. 1. У доноров почек со смертью мозга в плазме венозной крови выявлена активация протеолиза на фоне пропорционального увеличения активности ингибиторов протеиназ.

2. Уровень ТпА выше верхней границы нормы при дисфункции трансплантата и только в крови, оттекающей от почки. Проба из почечной вены по разработанной методике является более точной и может использоваться для определения уровня ТпА как до-

полнительного предиктора дисфункции трансплантата почки.

3. Уровни ингибиторов протеиназ не отличаются в зависимости от места взятия проб крови и от функции трансплантата почки.

4. Выявленный повышенный уровень пептидов группы СМ в периферической венозной крови доноров почек со смертью мозга, как показатель эндотоксемии, почти в четыре раза превышает значения у здорового человека.

5. Уровень пептидов группы СМ в почечной крови достоверно выше по сравнению с периферической венозной кровью, но нет статистически значимого различия в зависимости от функции почечного аллографта.

Литература

1. Галактионов, С. Г. Пептиды группы «средних молекул» / С. Г. Галактионов, В. М. Цейтин, В. И. Леонова // Биорганическая химия. – 1984. – Т. 10, № 1. – С. 5–17.
2. Карягина, И. Ю. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, α_1 антитрипсина и α_2 -макроглобулина в гастроэнтерологической клинике / И. Ю. Карягина, Р. А. Зарембский, М. Д. Балябина // Лабораторное дело. – 1990. – № 2. – С. 10–13.
3. Оценка белково-пептидного гомеостаза в плазме крови пациентов при состояниях, сопровождающихся эндогенной интоксикацией / В. В. Кирковский [и др.] // Военная медицина. – 2015. – № 2. – С. 70–72.
4. Способ взятия пробы крови из левой почечной вены у трупного донора: пат. 19197 Респ. Беларусь, МПК А 61В 17/00, G 01N 33/49 / Д. Н. Садовский, О. В. Калачик; заявитель Учреждение здравоохранения «9-я городская клиническая больница» – № а 20131153; заявл. 2013.10.07; опубл. 30.06.15 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2015. – № 3. – С. 56.
5. Способ определения «Средних молекул» / В. В. Николаичик [и др.] // Лабораторное дело. – 1991. – № 10. – С. 15–18.
6. Шамаева, Е. Н. Влияние специфических (антиген-зависимых) и неспецифических (антиген-независимых) факторов на отдаленные результаты трансплантации почки у больных сахарным диабетом 1 типа / Е. Н. Шамаева, М. В. Шестакова, Н. А. Томилина // Нефрология и диализ. – 2007. – Т. 9, № 2. – С. 136–142.
7. Keown, P. Predicting long-term outcome in renal transplantation / P. Keown // Kidney International. – 2013. – Vol. 84. – P. 650–652.
8. Middle molecular substances in acute renal failure / M. Mydlik [et al.] // International Urology and Nephrology. – 1982. – Vol. 14, № 1. – P. 67–73.
9. Middle molecules in patients with pre – dialysis chronic renal failure: a comparative clearance study / K. Schindhelm [et al.] // Clin. Nephrol. – 1982. – Vol. 17, № 4. – P. 200–205.
10. Nankivell, B. J. Chronic allograft nephropathy current concepts and future direction / B. J. Nankivell, J. R. Chapman // Transplantation. – 2006. – Vol. 81, № 5. – P. 643–654.

Поступила 29.02.2016 г.