

© Крутиков Е.С., Полищук Т.Ф., Польская Л.В., Шахназаров А.А., 2013

УДК: 616.63-008.6-08+616.155.1

КРУТИКОВ Е.С., ПОЛИЩУК Т.Ф., ПОЛЬСКАЯ Л.В., ШАХНАЗАРОВ А.А.

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС У БОЛЬНЫХ ХБП V СТАДИИ С АНЕМИЕЙ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ГЕМОДИАЛИЗОМ

KRUTIKOV E.S., POLISHCHUK T.F., POLSKAYA L.V., SHAKHNAZAROV A.A.

OXIDATIVE STRESS IN THE PATIENTS WITH CKD V STAGE AND ANEMIA WHO RECEIVE REPLACEMENT HEMODIALYSIS THERAPYГУ «Крымский государственный медицинский университет
имени С.И. Георгиевского» г. Симферополь
SI "Crimea State Medical University behalf of S.I. Georgievsky", Simferopol**Ключові слова:** *хронічна хвороба нирок, гемодіаліз, анемія, оксидативний стрес.***Key words:** *chronic kidney disease, dialysis, anemia, oxidative stress.***Резюме.** *Оксидативний стрес є складовою частиною патогенезу багатьох ускладнень, що розвиваються у хворих ХХН V стадії, які знаходяться на замісній терапії гемодіалізом. Синдром анемії - найбільш поширене ускладнення даної популяції хворих.**Мета.* *Метою цього дослідження було вивчення показників оксидативного стресу у хворих ХХН V стадії і анемією, які перебувають на замісній терапії гемодіалізом.**Матеріали і методи.* *Вивчені лабораторні показники 42 хворих з ХХН V стадії, пролонгованої гемодіалізом. За допомогою біохімічних методів досліджено перекисне окислення ліпідів: вивчені дієнові кон'югати (ДК), малоновий діальдегід (МДА), загальні кислоти і каталаза, ліпідний спектр мембран еритроцитів та їх осмотична резистентність.**Результати.* *Виявлено, що у хворих ХХН, що знаходяться на замісній терапії гемодіалізом, анемічний синдром пов'язаний з високою активністю оксидативного стресу, який, в свою чергу, може обумовлювати підвищену руйнацію еритроцитів. Так у хворих концентрація ДК у крові становила $1,12 \pm 0,26$ од.опт. щільн./мг ліпідів ($p < 0,01$), а рівень МДА $0,35 \pm 0,05$ од.опт. щільн./мг ліпідів ($p < 0,01$). У свою чергу рівень каталази, як одного з ферментів антиоксидантної системи, у хворих також достовірно знижувався до $0,029 \pm 0,0019$ мМ/л*с ($p < 0,001$). При цьому достовірно знижувалася осмотична резистентність еритроцитів. Вміст МДА має зворотний кореляційний взаємозв'язок з рівнем гемоглобіну в крові, при коефіцієнті парної кореляції $r = -0,36$. Дослідження ліпідної структури мембрани еритроцитів хворих методом тонкошарової хроматографії показало достовірне ($p < 0,05$) зниження рівня фосфоліпідів, моноліцеридів і вищих жирних кислот, і збільшення вмісту холестерину фракції.**Висновки.* *У хворих ХХН, що знаходяться на замісній терапії гемодіалізом, анемічний синдром пов'язаний з високою активністю оксидативного стресу, оскільки має зворотний взаємозв'язок між рівнем гемоглобіну та вмістом МДА в крові. Внаслідок оксидативного стресу змінюється ліпідний склад мембран еритроцитів хворого, оскільки окремі фракції ліпідів є субстратом для окислювальних процесів. Порушення ліпідного спектра мембран еритроцитів хворих, що знаходяться на програмному гемодіалізі, можливо, є однією з причин гемолізу.***Summary.** *The article presents research data of oxidative stress role in the pathogenesis of anemia in patients with CKD V stage, who receive hemodialysis replacement therapy.**Background.* *Oxidative stress is a part of the pathogenesis of many complications in patients with CKD stage V on replacement therapy with hemodialysis. Anemia syndrome is the most frequent complication of this patient's population.**Aim.* *The aim of this study was to study indicators of oxidative stress in patients with CKD stage V and anemia on replacement therapy with hemodialysis.**Materials and methods.* *We studied laboratory parameters in 42 hemodialysis patients with CKD V stage. Biochemical methods are used for investigation of lipid peroxidation processes: studied diene conjugates (DC), malondialdehyde (MDA), total lipids and catalase, lipid's structure of erythrocytes membranes and their osmotic resistance.**Results.* *We found that in dialysis patients anemic syndrome was associated with high activity of oxidative stress. Also increased destruction of red blood cells depends from high activity of oxidative stress. In the blood of the patients concentration of DC was $1,12 \pm 0,26$ opt.den. units/ mg of lipids ($p < 0,01$), and MDA level $0,35 \pm 0,05$ opt.den. units/ mg of lipids ($p < 0,01$). Levels of catalase,***Крутиков Евгений Сергеевич**
nephrostar@yandex.ru

decreased to $0,029 \pm 0,0019$ mm/l*sec ($p < 0,001$). Also osmotic resistance of erythrocytes significantly decreased. MDA has inverse correlation relationship with hemoglobin in the blood, with a correlation coefficient $r = -0,36$. Investigation of erythrocyte membrane lipid structure of patients by TLC showed a significant decrease of phospholipids and monoglycerides of higher fatty acids, and the increase of cholesterol fractions.

Conclusions. In patients with chronic kidney disease on dialysis replacement therapy anemic syndrome is associated with high activity of oxidative stress, as there is an inverse relationship between the level of hemoglobin and the content of MDA in blood. As a consequence of oxidative stress changes the lipid composition of erythrocyte membranes of the patient, because some fraction of lipids are substrates for oxidative processes. Impairment of lipid membranes of red blood cells of hemodialysis patients is one of the probably causes of anemia.

ВСТУПЛЕНИЕ. Оксидативный стресс является составной частью патогенеза многих заболеваний. Причиной возникновения окислительного стресса является увеличение продукции свободных радикалов и (или) снижение эффективности антиоксидантных систем организма [3, 7, 18]. Развитие хронической болезни почек также неразрывно связано с возникновением оксидативного стресса, поскольку именно он способствует быстрому прогрессированию основного заболевания, а также значительно ускоряет развитие осложнений [4, 10, 15]. Одним из частых осложнений у больных ХБП является анемия. Развиваясь на ранних стадиях заболевания почек и постепенно прогрессируя, анемия значительно ухудшает качество жизни и усугубляя жизненный прогноз [16]. Особенно выражен анемический синдром у больных с ХБП V стадией находящихся на заместительной почечной терапии гемодиализом.

Целью настоящего исследования явилась изучение показателей оксидативного стресса у больных ХБП V стадии и анемией, находящихся на заместительной терапии гемодиализом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Под наблюдением было 42 больных с ХБП V стадии, пролонгированной гемодиализом (ГД), находящиеся на лечении в отделении интенсивной нефрологии и диализа КРУ «КТМО Университетская клиника» г. Симферополя. Средний возраст больных составил $41,6 \pm 4,5$ лет. Все больные находились на бикарбонатном ГД 3 раза в неделю с длительностью сеанса 4-5 часов. Выраженность анемии у больных устанавливали согласно критериям EBP (2009 г.). Контрольная группа состояла из 35 практически здоровых лиц сопоставимых по полу и возрасту.

Во время исследования всем больным выполнялись стандартные методы диагностики, включающие общеклинические биохимические и инструментальные методы обследования. Дополнительно, для исследования патогенетических механизмов прогрессирования анемии у больных исследовались процессы перекисного окисления липидов. Изучалось количество общих липидов (ОЛ), первичных продуктов – диенового конъюгата (ДК) и содержание вторичных продуктов – малонового диальдегида (МДА), кроме того, исследовался уровень антиоксидантного фермента каталазы. Уровень ОЛ определяли по методу Дж.

Фолча. Содержание ДК определяли по методу В.Б. Гаврилова и М.И. Мишкорудной, концентрацию МДА определяли тиобарбитуровым методом [2]. Определение активности каталазы проводили методом Королюка М.А. и соавт. (1989).

Методом тонкослойной хроматографии проводилось исследование состояния липидного спектра мембраны эритроцитов. Тонкослойную хроматографию липидов осуществляли на стеклянных пластинах, покрытых тонким слоем силикагеля производства фирмы «Мерк». Хроматографическое разделение липидных фракций осуществляли с использованием системы органических растворителей содержащих гексан, диэтиловый эфир – леяной уксусной кислоты в соотношении 73:25:2.

Определение осмотической резистентности эритроцитов проводилось унифицированным методом в модификации Л.И. Идельсона.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 5,0 и MedStat.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ. В ходе исследований было отмечено, что у больных с ХБП V стадии, получающих заместительную терапию ГД, анемия развивалась в 98,4% случаях. При этом у больных с ХБП V стадии в плазме крови в несколько раз происходит увеличение содержания ДК, МДА. Так если в контрольной группе концентрация ДК составляла $0,37 \pm 0,08$ ед.опт.пл./мг липидов, то у обследованных больных равнялась $1,12 \pm 0,26$ ед.опт.пл./мг липидов ($p < 0,01$). Уровень МДА в контроле составлял $0,11 \pm 0,03$ ед.опт.пл./мг липидов, а у диализных больных возрастал до $0,35 \pm 0,05$ ед.опт.пл./мг липидов ($p < 0,01$). Необходимо отметить, что МДА сам по себе рассматривается некоторыми авторами в качестве возможного уремического токсина [13]. Также нами было выявлено, что содержание МДА имело обратную корреляционную взаимосвязь с уровнем гемоглобина в крови, при коэффициенте парной корреляции $r = -0,36$. Содержание ОЛ у больных ХБП V ст. наоборот снижалось и составляло $2,01 \pm 0,26$ мг/мл ($p < 0,01$) при уровне ОЛ в контроле $2,95 \pm 0,22$ мг/мл. Поскольку фракция ОЛ является субстратом для процессов перекисного окисления липидов, то их снижение на фоне высокой активности окислительного стресса, вероятно, является закономерностью. В свою очередь уровень каталазы, как

одного из ферментов антиоксидантной системы, с развитием уремии у больных также достоверно снижался до $0,029 \pm 0,0019$ мМ/л*с ($p < 0,001$). В контроле содержание каталазы в крови составляло $0,15 \pm 0,003$ мМ/л*с. Каталаза, играет важную роль в окислительном стрессе, поскольку участвует в разложении перекиси водорода [1]

При исследовании структуры мембраны эритроцитов больных методом тонкослойной хроматографии установлено достоверное снижение уровня фосфолипидов, моноглицеридов и высших жирных кислот, при этом увеличивается содержание холестерина фракции (таб. 1). Подобный состав липидов у больных с ХБП V стадии рассматривается как патологическое состояние мембраны эритроцитов, при котором она становится менее устойчивая к повреждающим факторам и разрушается. Известно, что окислительному стрессу подвержены фосфолипиды, моноглицериды и высшие жирные кислоты, но наиболее уязвимы в этом плане именно фосфолипиды, входящие в

состав клеточных мембран [8]. Подверженность мембран свободно-радикальному окислению связана с наличием двойных связей в остатках жирных кислот фосфолипидов, однородностью среды и высоким содержанием кислорода в липидном слое. Проникая в билипидный слой мембран, свободные радикалы инициируют цепные реакции автоокисления углеводов, в которые вовлекаются остатки жирных кислот фосфолипидов, в результате чего происходит их разрушение [5]. Механизм разрушения билипидного слоя заключается в образовании полярных групп (липопероксидов, кетонов, альдегидов) в гидрофобной области, что в итоге приводит к фрагментации фосфолипидов [6]. В цепные реакции автоокисления углеводов, протекающие в билипидном слое, также вовлекаются гидрофобные участки трансмембранных белков - Na^+/K^+ АТФа-зы и Ca^{2+} АТФа-зы, что приводит к нарушению их прочности [11].

Таблица 1

Липидный состав мембран эритроцитов у больных с ХБП V ст.

	Контроль (n=35)	ХБП V ст. (n=42)	p(t)
Фосфолипиды (%)	$10,36 \pm 0,71$	$4,11 \pm 0,54$	$p < 0,001$
Холестерин (%)	$4,85 \pm 0,28$	$15,48 \pm 0,47$	$p < 0,001$
Моноглицериды (%)	$7,23 \pm 0,34$	$6,29 \pm 0,15$	$p < 0,02$
Диглицериды (%)	$9,15 \pm 0,89$	$10,19 \pm 0,97$	$p > 0,05$
Триглицериды (%)	$8,24 \pm 0,19$	$8,06 \pm 0,18$	$p > 0,05$
Высшие жирные кислоты (%)	$15,7 \pm 0,89$	$6,51 \pm 0,74$	$p < 0,001$
Стериды (%)	$8,4 \pm 1,08$	$9,8 \pm 0,38$	$p > 0,05$
Неидентифицируемые липиды (%)	$36,07 \pm 3,22$	$39,56 \pm 2,43$	$p > 0,05$

Как доказательство вышесказанного нами было отмечено снижение осмотической резистентности эритроцитов у больных с ХБП V ст. (рис. 1). Если в контроле время полного разру-

шения эритроцитов, при помещении их в гипосмолярную среду составляло $32,7 \pm 1,4$ сек, то у больных с ХБП V стадии это время составляло $24,0 \pm 1,8$ сек ($p < 0,01$ по сравнению с контролем).

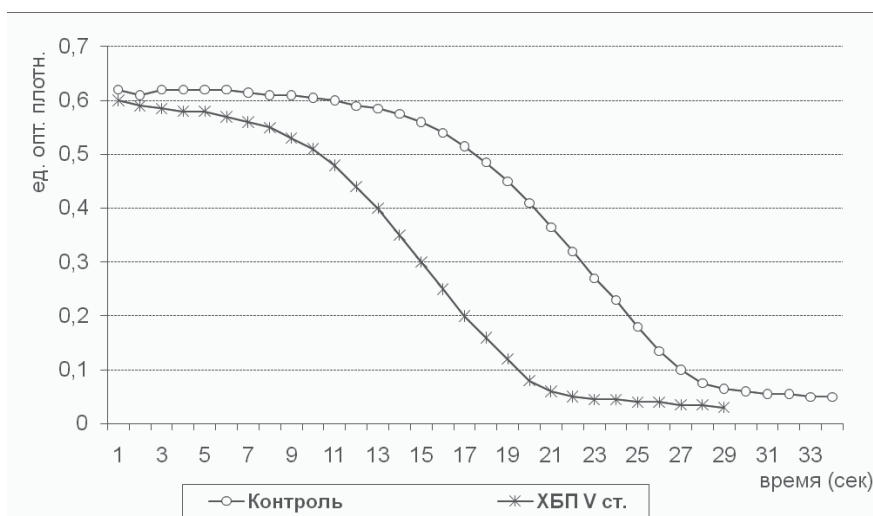


Рис. 1. Осмотическая резистентность эритроцитов у больных с ХБП V стадии.

В ходе исследования нами было отмечено, что сеанс программного ГД у больных приводит к снижению общего количества эритроцитов в среднем на $2,6 \pm 0,5$ %. По всей видимости, часть этих эритроцитов осталась в аппарате и магистралах (т.н. «аппаратные» кровопотери), а другая разрушилась во время сеанса. Гемолиз эритроцитов можно связать с активацией процессов перекисного окисления липидов во время сеанса ГД. Основной повреждающий эффект свободных радикалов заключается в разрушении мембран клеток и наибольшая их концентрация обнаруживается именно в эритроцитах. В свою очередь нами получены данные, указывающие на достоверную активацию оксидативного стресса в организме больных, после сеанса ГД. Так, если до сеанса содержание ДК в крови составляло $1,35 \pm 0,0018$ ед.опт.пл./мг липидов, то после проведения ГД этот показатель возрос до $1,41 \pm 0,0026$ ед.опт.пл./мг липидов ($p < 0,05$). Аналогично повысилось и содержание МДА с $0,32 \pm 0,02$ ед.опт.пл./мг липидов до $0,39 \pm 0,024$ ед.опт.пл./мг липидов ($p < 0,05$). При этом отмечалась тенденция к еще большему снижению ОЛ с $2,01 \pm 0,2$ мг/мл до $1,96 \pm 0,4$ мг/мл ($p > 0,05$) и достоверному снижению антиоксидантного фермента – каталазы до $0,018 \pm 0,002$ мМ/л*с ($p < 0,05$).

На наличие гемолиза эритроцитов у больных во время сеанса ГД указывают многие авторы [16]. Одни авторы выводят на первый план интоксикацию алюминием и воздействие на эритроциты различных токсических веществ [17]. Другие связывают деструкцию эритроцитов во время процедуры ГД с механическим контактом клеток крови с мембраной диализатора [9]. Уже давно установлено, что в результате контакта крови с мембраной диализатора происходит активация иммуно-компетентных клеток и высвобождение из них провоспалительных субстанций, а это в свою очередь тесно связано с оксидативным стрессом [12, 14]. На наш взгляд активация окислительных процессов в мембранах эритроцитов у больных после диализа именно и может быть вызвана усиленной генерацией свободных радикалов кислорода нейтрофилами и моноцитами периферической крови. Или может быть следствием недостаточной активности антиоксидантной системы.

Таким образом, высокая активность оксидативного стресса в организме больных с ХБП V ст., находящихся на лечении заместительной терапией гемодиализом имеет прямую взаимосвязь с анемическим синдромом. Причем на фоне оксидативного стресса у таких больных отмечается низкая активность антиоксидантной системы. Возможно, что оксидативный стресс приводит к несостоятельности липидного спектра мембран эритроцитов, поскольку некоторые фракции липидов (фосфолипиды, высшие жирные кислоты, моноглицериды) яв-

ляются субстратом для окислительных процессов. Развитие патологии мембраны эритроцитов ведет в свою очередь к тому, что они становятся плохо проницаемыми и не справляются со своей главной функцией: избирательно пропускать в клетку одни ионы и молекулы и задерживать другие. В следствие чего эритроциты становятся менее стойкими и быстро разрушаются, а у больного развивается и прогрессирует анемия. Сеанс гемодиализа приводит к еще большему нарастанию окислительных процессов в организме больных, при этом после процедуры снижается общее количество красных клеток крови.

ВЫВОДЫ.

У больных ХБП, находящихся на заместительной терапии гемодиализом анемический синдром связан с высокой активностью оксидативного стресса, поскольку имеется обратная взаимосвязь между уровнем гемоглобина и содержанием малонового диальдегида в крови.

Вследствие оксидативного стресса изменяется липидный состав мембран эритроцитов больного, поскольку отдельные фракции липидов (фосфолипиды, высшие жирные кислоты, моноглицериды) являются субстратом для окислительных процессов.

Нарушение липидного спектра мембран эритроцитов больных, находящихся на программном гемодиализе, возможно, является одной из причин гемолиза

В процессе сеанса гемодиализа происходит активация оксидативного стресса в организме больных, в результате чего усиливается гемолиз эритроцитов и как следствие прогрессирует анемия.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ганеева А.Т. Антиоксидантный статус крови у больных с терминальной почечной недостаточностью на программном гемодиализе / А.Т. Ганеева // Сборник трудов Международной нефрологической конференции «Белые ночи»: XI Ежегодного нефрологического семинара: СПб. – Россия, 2003, – С.42.
2. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение гидроперекисей в плазме крови. / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело.- 1988.- №3.-С.34-37.
3. Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.] – Новосибирск: АР-ТА, 2008. – 284 с.
4. Нагорная Н.В. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки / Н.В. Нагорная, Н.А. Четверик // Здоровье ребенка.- 2010.-№2(23). - С.31-35.
5. Саенко Ю.В. Роль оксидативного стресса в патологии сердечно-сосудистой системы у больных с заболеваниями почек. (Сообщение I. Патофизиология оксидативного стресса) /

- Ю.В. Саенко., А.М. Шутов // Нефрология и диализ. – 2004. – Т.6. – №1. – С.47-53.
6. *Cakir-Atabek H.* Effects of different resistance training intensity on indices of oxidative stress / H. Cakir-Atabek, S. Demir, R. Pinarbassili [et al.] // Journal of Strength and Conditioning Research. – 2010. № 9(24). – P.2491-2498.
 7. *Donate T.* Protein oxidative stress in dialysis patients / T. Donate, A. Herreros, E. Martinez [et al.] // Adv Perit Dial. – 2002. – №18. – P.15-17.
 8. *Hasdan G.* Endothelial dysfunction and hypertension in 5/6 nephrectomized rats are mediated by vascular superoxide / G. Hasdan, S. Benchetrit, G. Rashid [et al.] // Kidney Int. – 2002. – №61. – P.586-590.
 9. *Ibrahim Varan H, Belda Dursun, Evrim Dursun, et al* Acute effects of hemodialysis on oxidative stress parameters in chronic uremic patients: Comparison of two dialysis membranes / H. Ibrahim Varan, B. Dursun, E. Dursun [et al.] // International Journal of Nephrology and Renovascular Disease. – 2010. – V.3, №4. – P. 39 - 45
 10. *Krane V.* The metabolic burden of diabetes and dyslipidaemia in chronic kidney disease / V. Krane, C. Wanner // Nephrol Dial Transplant. – 2002. – №17 (Suppl. 11) – P.23-27.
 11. *Martarelli D.* Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training / D. Martarelli, M. Verdenelli // Current Microbiology. – 2011. – №6(62). – P.1689-1696.
 12. *Morena M.* Oxidative stress in hemodialysis patients: Is NADPH oxidase complex the culprit? M. Morena, J. Cristol, L. Senécal [et al.] // Kidney International. – 2002. – V.61, №7. – P.109–S114.
 13. *Patterson Claire S.* Dynamic study of oxidative stress in renal dialysis patients based on breath ethane measured by optical spectroscopy / Claire S Patterson, Lesley C McMillan, Karen Stevenson [et al.] // J. Breath Res. – 2007. – V.1, №2. – P.1752-1755.
 14. *Schettler V.* Oxidative stress during dialysis: effect on free radical scavenging enzyme (FRSE) activities and glutathione (GSH) concentration in granulocytes / V Schettler, E Wieland, H Methe [et al.] // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2009. – V.13, №10. – P. 2588-2593.
 15. *Shojaei, E.* Effect of moderate aerobic cycling on some systemic inflammatory markers in healthy active collegiate men / E. Shojaei, A. Farajoy // International Journal of General Medicine. – 2011. – №2.(24). – P.79-84.
 16. *Swarnalatha G.* Oxidative stress in hemodialysis patients receiving intravenous iron therapy and the role of N-acetylcysteine in preventing oxidative stress / G. Swarnalatha, R. Ram, P. Neela [et al.] // Saudi J Kidney Dis Transpl. – 2010 Sep;21(5). – P. 852-8.
 17. *Vaziri N.D.* Oxidative stress and dys-regulation of superoxide dismutase and NADPH dismutase in renal insufficiency / N.D.Vaziri, M. Dicus, N.D Ho [et al.] // Kidney Int. – 2003. – № 63. – P.179-185.
 18. *Walsh N.* Position Statement. Part One: Immune Function and Exercise / N. Walsh, M. Gleeson // Exercise Immunology Review. – 2011. – №17 – P.6-63.

Надійшла до редакції 11.12.2012

Прийнята до друку 19.02.2013

© Романенко О.А., Степанова Н.М., Руденко А.В., Кругліков В.Т.,
Лебідь Л.О., Колесник М.О., 2013

УДК: 616.61-002.3-055.2

**О.А. РОМАНЕНКО, Н.М. СТЕПАНОВА, А.В. РУДЕНКО,
В.Т. КРУГЛІКОВ, Л.О. ЛЕБІДЬ, М.О. КОЛЕСНИК**

ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБНОГО СПЕКТРУ СЕЧОСТАТЕВОЇ СИСТЕМИ ЖІНОК З РЕЦИДИВУЮЧИМ ПІЄЛОНЕФРИТОМ

*O. ROMANENKO, N. STEPANOVA, A. RUDENKO, V. KRUGLIKOV, L. LEBID, M. KOLESNYK,
FEATURES OF THE MICROBIAL SPECTRUM UROGENITAL SYSTEM OF WOMEN
WITH RECURRENT PYELONEPHRITIS*

ДУ «Інститут нефрології НАМН України», м. Київ

SI “Institute of Nephrology NAMS of Ukraine“, Kyiv

Ключові слова: рецидивуючий пієлонефрит, збудники, бактеріальне навантаження сечі, уретри, піхви, цервікального каналу.

Романенко Оксана Антонівна
oksromanenko@ukr.net

Key words: recurrent pyelonephritis, etiological agents, urinal's, urethral's, vaginal's and cervical canal's bacterial weight.

Резюме. Метою нашого дослідження було визначити особливості мікробного спектру сечостатевої системи жінок з рецидивуючим пієлонефритом.