

# Vplyv prírodných antioxidantov na markery oxidačného stresu u pacientov po transplantácii obličky.

RNDr. Zuzana Szentesiová<sup>1</sup>  
(biochémia)

Spoluautori: Zuzana Paduchová<sup>1</sup>, Martina Horváthová<sup>1</sup>, Zuzana Országhová<sup>1</sup>, Zuzana Žilinská<sup>2</sup>, Branislav Trebatický<sup>2</sup>

Školiteľ: doc. RNDr. Jana Muchová, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, <sup>2</sup>Urologické oddelenie, Univerzitná nemocnica, Bratislava

## Úvod

Transplantácia obličky (TO) je považovaná za najlepšiu substitučnú terapiu v konečnom štádiu ochorenia obličiek, pretože je spojená so zlepšeným prežívaním a kvalitou života v porovnaní s hemodialýzou. Transplantácia obličiek vedie v porovnaní s dialyzovanými pacientmi takmer, k normalizácii redoxnej nerovnováhy. Avšak pri TO môžu OS indukovať iné faktory, ako napr. ischémia / reperfúzia, ktorá sprevádza samotný chirurgický zákrok; imunitná odpoveď aloštetu; infekcia a imunosupresívna terapia (1, 2, 3).

Ischemicko-reperfúzne (I / R) poškodenie obličiek je výsledkom zvýšeného oxidačného stresu, ktorý spôsobuje zápal a poškodenie tubulárnych buniek (4). Aj keď po transplantácii obličky dochádza k zlepšeniu metabolických porúch, oxidačný stav počas a po transplantácii nie je jednoznačne pochopený (5). Radikály, ako je superoxidový a hydroxylový radikál, ľahko interagujú s molekulárnymi zložkami nefrónu: oxidujú bočné reťazce aminokyselín, čo vedie k strate dôležitých funkčných vlastností proteínov; dochádza k peroxidácii lipidov bunkových membrán, čo vedie k zníženej životaschopnosti membrány a v dôsledku oxidačného poškodenia renálnej DNA k jej štiepeniu, zosieťovaniu DNA a k vzniku mutácií, čo podporuje ďalšie poškodenie obličky. Zároveň, zápalové procesy sú zdrojom ďalších voľných radikálov, čo môže mať za následok ďalšie poškodenie obličkového tkaniva (6). Zvýšené markery oxidačného stresu po transplantácii obličiek potvrdili niekoľké štúdie (7, 8, 9, 10, 11, 12), zatiaľ čo v iných bol zvýšený OS pozorovaný iba v počiatočnej fáze po TO (13, 14).

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť účinok vybraných látok s antioxidantnými a biomodulačnými vlastnosťami (polyfenolový extrakt Pycnogenol<sup>®</sup>, vitamíny C a vitamín E) na funkciu obličiek, metabolické parametre, ako aj na markery oxidačného stresu u pacientov po transplantácii obličky so stabilnou funkciou štetu.

## Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 29 pacientov (55,21 ± 12,42 rokov) po TO, ktorí boli v priebehu 3 mesiacov denne suplementovaní antioxidantmi (vitamín C (250 mg), E (200 mg) a Pycnogenol (50 mg)). Pacienti boli vyšetrení pred začiatkom suplementácie, po 3 mesiacoch suplementácie a 1 mesiac po jej ukončení. Všetci pacienti súhlasili so zaradením do štúdie a podpísali informovaný súhlas. Základné biochemické parametre boli analyzované štandardnými metódami v akreditovanom klinicko-biochemickom laboratóriu. Oxidačné poškodenie lipidov a proteínov, aktivita katalázy, ako aj celková antioxidantná kapacita boli stanovené spektrofotometricky. Na stanovenie koncových produktov pokročilej glykácie (AGEs) proteínov bola využitá fluorescenčná metóda a na zistenie aktivity antioxidantných enzýmov SOD (Sigma Aldrich, Nemecko) a GPx (Cayman Chemical, USA) sa použili komerčné sety. Údaje boli štatisticky spracované prostredníctvom programu IBM SPSS ver. 21.

## Výsledky

V Tab. 1 sú uvedené hodnoty biochemických parametrov pacientov, v priemere 7.9 rokov po TO, pred a po suplementácii antioxidantmi. Po 3 mesiacoch suplementácie sme zistili signifikantne vyššiu koncentráciu celkových bielkovín (o 3,05 %) a z funkčných parametrov obličky nižšiu koncentráciu S-KREA (o 5,42 %) a vyššiu glomerulárnu filtráciu MDRD3 (o 7,97 %). Po suplementácii sa u pacientov významne znížila koncentrácia TCH (o 10,45 %), aktivita AST (o 14,71 %) a GMT (o 22 %). Mesiac po ukončení suplementácie sa zvýšili koncentrácie S-KREA (o 6,55 %), TCH (o 5 %), AST (o 2,94 %) a GMT (o 26 %), pričom sa znížila koncentrácia celkových bielkovín (o 1,18 %) a MDRD3 (o 8,93 %).

**Tab.1: Biochemické parametre pacientov**

Parameter	suplementácia			
	pred	po 3 mesiacoch	p	1 mesiac po ukončení
Pacienti (ž/m)	29 (14/15)			
GLU (mmol/l)	5,95 ± 1,06	5,90 ± 0,97	n. s.	6,20 ± 1,47
Celkové bielkoviny (g/l)	65,99 ± 4,16	68,00 ± 3,92	<0,001	67,21 ± 3,75
ALB (g/l)	44,84 ± 2,93	45,23 ± 2,20	n. s.	44,84 ± 3,35
S-KREA (μmol/l)	95,95 ± 17,79	91,02 ± 19,85	0,016	96,98 ± 18,99
S-UREA (mmol/l)	5,86 ± 1,57	6,08 ± 1,84	n. s.	6,43 ± 1,85
MDRD3 (ml/s/1,73 m <sup>2</sup> )	1,13 ± 0,26	1,22 ± 0,29	0,005	1,12 ± 0,24
TCH (mmol/l)	4,86 ± 0,70	4,40 ± 0,86	0,002	4,62 ± 0,85
AST (μkat/l)	0,39 ± 0,12	0,34 ± 0,08	0,001	0,35 ± 0,08
ALT (μkat/l)	0,40 ± 0,14	0,35 ± 0,10	n. s.	0,38 ± 0,11
GMT (μkat/l)	0,61 ± 0,33	0,50 ± 0,33	<0,001	0,63 ± 0,41
ALP (μkat/l)	1,26 ± 0,45	1,23 ± 0,45	n. s.	1,29 ± 0,47
BIL (μmol/l)	10,86 ± 5,53	10,48 ± 4,36	n. s.	9,44 ± 3,82
CRP (mg/l)	2,67 ± 2,87	2,66 ± 2,26	n. s.	2,75 ± 1,87

GLU – glukóza; ALB – albumín; S-KREA – kreatinín v sére; S-UREA – močovina v sére; U-KREA – kreatinín v moči; U-UREA – močovina v moči, MDRD3 – glomerulárna filtrácia, TCH – celkový cholesterol; AST – aspartátaminotransferáza; ALT – alanínaminotransferáza; GMT – gamaglutamyltransferáza; ALP – alkalická fosfatáza; BIL – bilirubín; CRP – C-reaktívny proteín

Tab. 2 uvádza významné zníženie markerov oxidačného poškodenia lipidov – LPx (o 27,59 %), 8-isoP (o 14,17 %) a signifikantné zníženie oxidačného poškodenia proteínov – AOOP (o 23,68 %) po 3 mesiacoch suplementácie. Štatisticky významný pokles bol zistený aj pri koncových produktoch pokročilej glykácie – AGEs (o 7,90 %). Aktivita antioxidantných enzýmov – SOD (o 7,73 %), GPx (o 6,82 %) a KAT (o 3,66 %) po suplementácii významne vzrástla avšak, hodnota celkovej antioxidantnej aktivity bola štatisticky významne nižšia (o 6,22 %).

**Tab. 2: Priemerné hodnoty markerov oxidačného poškodenia, aktivít antioxidantných enzýmov a celkovej antioxidantnej kapacity pred a po suplementácii**

Parameter	suplementácia			
	pred	Po 3 mesiacoch	p	1 mesiac po ukončení
<b>Oxidačné poškodenie</b>				
LPx (nmol/ml)	33,99±11,95	28,64±8,37	0,011	42,31±21,32
8-izoP (pg/ml)	27,16±9,02	23,79±6,90	0,034	24,68±7,24
AOOP (μmol/l)	24,99±11,82	20,82±8,56	0,048	29,64±16,45
AGEs (AU/g proteínu)	445,60±149,55	409,86±122,58	0,025	467,47±159,28

<b>Antioxidačné enzýmy a celková antioxidačná kapacita</b>				
SOD (U/mg Hb)	217,76±71,01	243,09±91,78	<b>0,026</b>	239,22±93,27
GPx (μkat/mg Hb)	0,44±0,11	0,52±0,12	<b>0,019</b>	0,47±0,11
KAT (μkat/g Hb)	3,48±1,03	4,00±1,09	<b>0,027</b>	3,40±0,76
TEAC (mmol/l)	4,10±1,13	3,86±0,93	<b>0,031</b>	4,00±1,00

– LPx – lipoperoxidy, 8-izoP – 8-izoprostány, AOPP - produkty pokročilej oxidácie proteínov, AGEs – koncové produkty pokročilej glykácie proteínov, SOD – superoxididismutáza, GPx – glutatiónperoxidáza, KAT – kataláza, TEAC – celková antioxidačná kapacita

## Diskusia

Transplantácia obličiek je sprevádzaná normalizáciou funkcie obličiek a normalizáciou redoxnej rovnováhy. Zlepšenie parametrov oxidačného stresu po transplantácii obličky v porovnaní s výsledkami u dialyzovaných pacientov potvrdzujú aj naše predchádzajúce výsledky (15). Napriek tomu sme aj u pacientov po TO zistili vyššiu hladinu parametrov oxidačného stresu a zníženu aktivitu antioxidačných enzýmov, ako aj antioxidantov s nízkou molekulovou hmotnosťou. Preto bola táto štúdia zameraná na sledovanie účinku kombinovanej suplementácie vitamínmi C a E a prírodným polyfenolovým extraktom na renálne funkcie a parametre súvisiace s OS. Výsledky ukázali, že 3-mesačná suplementácia zlepšila glomerulárnu filtráciu, niektoré biochemické parametre v sére (celkové bielkoviny, kreatinín, TCH, AST, GMT a UA), ako aj redoxnú rovnováhu organizmu.

Z funkčných parametrov obličiek sme zistili zvýšenú glomerulárnu filtráciu, s čím súvisí aj zníženie koncentrácie sérového kreatinínu. Zníženie koncentrácie kreatinínu v sére je v súlade so štúdiou Loonga a kol. (16), kde autori v skupine 5-tich pacientov suplementovaných vitamínom C a/alebo E zaznamenali pokles sérového kreatinínu o vyše 20 %. Zistili sme aj zníženie aktivít pečenej enzýmov – AST a GMT, hodnoty ktorých sa pohybovali na hornej hranici referenčných hodnôt, pravdepodobne v dôsledku imunopresívnej terapie.

Keďže oxidačný stres u pacientov s CKD, ale aj po TO, je často spojený s kardiovaskulárnymi komplikáciami, pozitívne hodnotíme zníženie koncentrácie TCH.

Priaznivý vplyv Pyc na hladiny lipoproteínov preukázali Deravaj a kol. (17). Účinok Pyc na lipidový profil bol potvrdený aj v štúdiu Kocha (18), v ktorej sa zistilo, že Pyc významne znížil hladiny celkového cholesterolu a LDL v krvi, zatiaľ čo HDL zostal nezmenený.

Z markerov oxidačného poškodenia sme u sledovaných pacientov po suplementácii zaznamenali významné zníženie LPx a 8-izoP, čo je v súlade s výsledkami randomizovanej štúdie Williamsa a kol. (19). Zvýšenie aktivít sledovaných antioxidačných enzýmov, pozorované v našej štúdiu, bolo zistené aj v štúdiu Leea a kol. (20), kde aktivity antioxidačných enzýmov SOD a GPx významne vzrástli už po 3 dňoch podávania vitamínu C, a v štúdiu Yildiza a kol. (21), sa zistili významne zvýšené aktivity SOD a KAT po kombinovanej suplementácii melatonínom a vitamínom C. Vplyv Pyc na antioxidačné enzýmy SOD, GPx, KAT študoval Xiao et al. (22) a zistil, že Pyc významne zlepšil nielen aktivitu antioxidačných enzýmov, ale zvýšil aj hladinu glutatiónu (GSH). Podobné výsledky boli získané v animálnych štúdiách. Zistené zníženie celkovej antioxidačnej kapacity plazmy, pozorované v našej štúdiu súvisí pravdepodobne so znížením koncentrácie kyseliny močovej ( $326.31 \pm 58.33 \mu\text{mol/l}$  pred suplementáciou vs.  $304.64 \pm 60.95 \mu\text{mol/l}$  po 3-mesačnej suplementácii ( $p = 0,019$ )).

V porovnaní s uvedenými štúdiami sme použili nižšie dávky vitamínov, nakoľko sme v experimentoch *in vitro* potvrdili synergický, resp. aditívny účinok Pycnogenolu spolu s vitamínom C, resp. troloxom (vo vode rozpustný analóg vitamínu E) (23).

Na základe získaných výsledkov môžeme povedať, že podávanie antioxidantov zlepšuje funkciu transplantovanej obličky, zlepšuje lipidový profil a redoxnú nerovnováhu, čo môže zlepšiť kvalitu života pacientov po transplantácii obličky.

### **Zoznam použitej literatúry**

1. Agodi A, Barchitta M, Maugeri A, Basile G, Zamboni M, Bernardini G, Corona D, Veroux M: Unveiling the Role of DNA Methylation in Kidney Transplantation: Novel Perspectives toward Biomarker Identification. *Biomed Res Int* 2019; 15: 1602539.
2. Cerrillos-Gutiérrez JI, Miranda-Díaz GA, Preciado-Rojas P, Gómez-Navarro B, Sifuentes-Franco S, Carrillo-Ibarra S, Andrade-Sierra J, Rojas-Campos E, Cueto-Manzano AM: The Beneficial Effects of Renal Transplantation on Altered Oxidative Status of ESRD Patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016: 5757645.
3. Kopecky C, Haidinger M, Birnen-Grünberger R, Darnhofer B, Kaltenecker CC, Marsche G, Holzer M, Weichhart T, Antlanger M, Kovarik JJ, Werzowa J, Hecking M, Säemann MD: Restoration of renal function does not correct impairment of uremic HDL properties. *J. Am. Soc. Nephrol* 2015; 26: 565-575.
4. Tabriziani H, Lipkowitz MS, Vuong N: Chronic kidney disease, kidney transplantation and oxidative stress: a new look to successful kidney transplantation. *Clin Kidney J* 2018; 11(1): 130-135.
5. Vural A, Yilmaz MI, Caglar K: Assessment of oxidative stress in the early posttransplant period: Comparison of cyclosporine A and tacrolimus-based regimens. *Am J Nephrol* 2005; 25(3): 250-255.
6. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ: Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 806358.
7. Eschwege P, Paradis V, Conti M, Holstege A, Richet F, Deteve J, Menager P, Legrand A, Jardin A, Bedossa P, Benoit G: In situ detection of lipid peroxidation by-products as markers of renal ischemia injuries in rat kidney. *J Urol* 1999; 162: 553-7.
8. Waller HL, Harper SJ, Hosgood SA, Bagul A, Yang B, Kay M, Nicholson ML: Biomarkers of damage to predict ischaemia-reperfusion injury in an isolated organ perfusion model of the transplanted kidney. *Free Radic Res* 2006; 40: 1218-25.
9. Yun Y, Duan WG, Chen P, Wu HX, Shen ZQ, Qian ZY, Wang DH: Ischemic postconditioning modified renal oxidative stress and lipid peroxidation caused by ischemic reperfusion injury in rats. *Transplant Proc* 2009; 41: 3597-602.
10. Hosseini F, Naseri MK, Badavi M, Ghaffari MA, Shahbazian H, Rashidi I: Effect of beta carotene on lipid peroxidation and antioxidant status following renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70: 259-63.
11. Simic-Ogrizovic S, Simic T, Reljic Z, Markovic S, Blagojevic R, Radivojevic D, Lezaic V, Djukanovic L, Mimic-Oka J: Markers of oxidative stress after renal transplantation. *Transpl Int* 1998; 11(1): S125-9.
12. Campise M, Bamonti F, Novembrino C, Ippolito S, Tarantino A, Cornelli U, Lonati S, Cesana BM, Ponticelli C: Oxidative stress in kidney transplant patients. *Transplantation* 2003; 76(10): 1474-8.
13. Ardalan MR, Estakhri R, Hajipour B, Ansarin K, Asl NA, Nasirizade MR, Azar AN, Ghorbanihaghjou A, Vatankhah AM, Esmaili HA: Erythropoietin ameliorates oxidative stress and tissue injury following renal ischemia/reperfusion in rat kidney and lung. *Med Princ Pract* 2013; 22(1): 70-4.
14. Zahmatkesh M, Kadkhodae M, Mahdavi-Mazdeh M, Ghaznavi R, Hemati M, Seifi B, Golab F, Hasani K, Lessan-Pezeshki M, Einollahi B: Oxidative stress status in renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant* 2010; 8(1): 38-44.

15. Országhová Z, Paduchová Z, Chomová M, Horváthová M, Ježovičová M, Žilinská Z, Trebatický B, Muchová J: Redox stav pacientov s chronickým ochorením obličiek - transplantácia versus hemodialýza. *Lekársky obzor* 2017; 66(10-11): 340-345.
16. Loong CC, Chang YH, Wu TH, King KL, Yang WC, Wu CW, Lui WY: Antioxidant supplementation may improve renal transplant function: a preliminary report. *Transplant Proc* 2004; 36: 2438-9.
17. Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schönlaue F, Rohdewald P, Jialal I: Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* 2002; 37(10): 931-934.
18. Koch R: Comparative study of Venostasin and Pycnogenol for treatment in chronic venous insufficiency. *Phytother Res* 2002; 16(1): S1-S5.
19. Williams MJ, Sutherland WH, McCormick MP, de Jong SA, McDonald JR, Walker RJ: Vitamin C improves endothelial dysfunction in renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(6): 1251-1255.
20. Lee JI, Son HY, Kim MC: Attenuation of ischemia-reperfusion injury by ascorbic acid in the canine renal transplantation. *J Vet Sci* 2006; 7:375-9.
21. Yıldız Y, Amasyalı AS, Şirinyıldız F, Yeşilçayır GT, Orak C, Ergin K, Yılmaz M, Cesur G, Ek RO: The protective effects of melatonin and vitamin c against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Biomedical Research* 2016; S463-S468.
22. Xiao P, Zhang K, Tao Z, Liu N, Ge B: Cardioprotective effect of Pycnogenol in ischemic-reperfusion injury (IRI) in rats. *Cell Mol Biol* 2017; 63(10): 49-53.
23. Sivoňová M, Žitňanová I, Horáková L, Strosová M, Muchová J, Balgavý P, Dobrota D, Ďuračková Z: The combined effect of pycnogenol with ascorbic acid and trolox on the oxidation of lipids and proteins. *Gen Physiol Biophys* 2006; 25(4): 379-96.