

СМИРНОВА

ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

Роль нарушения оксидативного статуса у больных системной
красной волчанкой в развитии факторов риска сердечно-сосудистых
заболеваний

14.01.04 – внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре внутренних болезней Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН

Мухин Николай Алексеевич

Официальные оппоненты:

Профессор кафедры клинической фармакологии и терапии
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
непрерывного профессионального образования»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор

Гиляревский Сергей Руджерович

Ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
ревматологии имени В.А. Насоновой»
Российской академии медицинских наук,
доктор медицинских наук

Бекетова Татьяна Валентиновна

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» _____ года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.18 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117292, г. Москва, ул. Вавилова, д.61; ГБУЗ ГКБ имени В.В. Виноградова ДЗМ).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6).

Автореферат разослан «__» _____ 2018 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Киякбаев Гайрат Калыевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Введение в терапевтическую практику современных иммуносупрессивных средств значительно изменило течение системной красной волчанки (СКВ), поэтому в настоящее время важную роль среди причин смертности при СКВ играют отдаленные осложнения, связанные с ранним развитием атеросклероза. В исследовании (Manzi S. и соавт., 1997) было обнаружено, что частота инфаркта миокарда среди больных СКВ женского пола в возрасте от 35 до 44 лет более чем в пятьдесят раз выше, чем в популяции женщин аналогичного возраста; по данным мета-анализа десяти популяционных исследований частота ОНМК у больных СКВ в 2,53 раза превышала таковую в общей популяции (Holmqvist M. и соавт., 2015); также у больных СКВ были отмечены более частые субклинические проявления атеросклероза (толщина комплекса интима-медиа и количество атеросклеротических бляшек в сонных артериях) (Chuang Y.W. и соавт., 2015, Wu G.C. и соавт., 2016), при этом наличие традиционных факторов риска не способно в полной мере объяснить подобное явление. Среди возможных причин ускоренного развития атеросклероза обсуждают персистирующее воспаление и нарушение оксидативного статуса, приводящие к дисфункции и повреждению эндотелия.

Нейтрофилы являются одним из основных источников активных форм кислорода (АФК) и, соответственно, оксидативного стресса, в организме человека. На мышинных моделях атеросклероза *ApoE*^{-/-}/*LDLR*^{-/-}, нокаутных по генам аполипопротеина E и рецептора ЛПНП, было обнаружено, что ингибирование ферментов, обеспечивающих образование АФК в ходе респираторного взрыва: НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО) – подавляет прогрессирование атеросклероза (Liu C. и соавт., 2012, Kinkade K. и соавт., 2013). В исследовании (Vuilleumier N. и соавт., 2013) уровень МПО сыворотки крови был значимым предиктором тяжелых сердечно-сосудистых осложнений. По современным данным, нейтрофилы участвуют в патогенезе СКВ, а также играют важную роль в развитии атеросклероза благодаря способности образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) в ходе нетоза, одного из механизмов клеточной смерти, характерного для нейтрофилов. Megens R.T. и соавт. было показано, что нестабильность атеросклеротических бляшек коррелирует с уровнем нетоза нейтрофилов, инфильтрирующих бляшки. Knight J.S. и соавт. на мышинных моделях атеросклероза *ApoE*^{-/-}, нокаутных по гену аполипопротеина E, продемонстрировали, что подавление образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) уменьшает атеросклеротическое поражение сосудов. Белки S100A8, A9, A8/9 и A12 (выделяемые активированными нейтрофилами, и связанные с воспалением и атеросклерозом), повышение уровня которых является прогностическими факторами развития ССЗ в общей

популяции. предложены в качестве возможных биомаркеров раннего атеросклероза при СКВ, тем не менее, этот факт требует дальнейшего подтверждения.

Негативное действие оксидативного стресса при СКВ связывают с образованием окисленных форм белков и ДНК, повреждением липидных мембран (Shah D. и соавт., 2013). В исследовании (Lopez L.R. и соавт., 2005) было продемонстрировано, что повышенный уровень окисленных липопротеинов низкой плотности является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у больных СКВ. Также существуют данные о влиянии оксидативного стресса на индукцию апоптоза и некроза при СКВ, образование аутоантигенов и повреждение тканей (Kurien V.T. и соавт., 2008, Kumagai S. и соавт., 2003).

О нарушениях оксидативного статуса при СКВ в литературе имеются отрывочные сведения, а комплексное изучение не проводилось. Наличие ассоциаций оксидативных нарушений при СКВ с нарушением липидного обмена и частоты развития сердечно-сосудистых осложнений не исследовалось. Учитывая сложный патогенез заболевания целесообразно изучение выраженности нарушения оксидативного статуса, в том числе как риска раннего развития атеросклероза.

Цель исследования

Изучить особенности оксидативного статуса у больных СКВ и оценить их взаимосвязь с риском развития сердечно-сосудистых осложнений.

Задачи исследования

1. Определить показатели функциональной активности нейтрофилов как источников активных форм кислорода и уточнить выраженность оксидативного стресса по доле окисленного альбумина в группе больных СКВ и группе здоровых доноров.
2. Оценить антиоксидантную активность плазмы крови в группе больных СКВ и здоровых доноров; в группах больных СКВ, получавших и не получавших лечение цитостатиками.
3. Изучить взаимосвязь выраженности иммуновоспалительной реакции и висцеритов с нарушением оксидативного статуса в группах больных активным волчаночным нефритом (ВН), неактивным ВН и больных без поражения почек; у больных СКВ с различной выраженностью активности заболевания, оцененной с помощью индекса SLEDAI; с различной выраженностью повреждения органов, оцененного с помощью индекса SDI; в группах больных СКВ, получавших активную иммуносупрессивную терапию, и больных, получавших поддерживающее лечение.
4. Сравнить хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на воздействие цитокинов: ИЛ-1 β

и ГКС-Ф в группе больных СКВ и группе здоровых доноров.

5. Выявить частоту сердечно-сосудистых заболеваний и развития гиперлипидемии в группе больных СКВ.

6. Изучить взаимосвязь нарушения оксидативного статуса у больных СКВ с риском развития сердечно-сосудистых осложнений и гиперлипидемией.

Научная новизна

Впервые была изучена функциональная активность нейтрофилов больных СКВ, связанная с образованием свободных радикалов с применением хемилюминесцентных методик с двухстадийной стимуляцией и регистрацией кинетической кривой хемилюминесценции. Показано, что нейтрофилы больных СКВ находятся в активированном и праймированном состоянии по сравнению с нейтрофилами здоровых доноров, активированное и праймированное состояние нейтрофилов при СКВ индуцированы провоспалительными цитокинами, в частности, интерлейкином-1 β (ИЛ-1 β).

Впервые показано, что показатели функциональной активности нейтрофилов: удельная интегральная и пиковая активности нейтрофила коррелируют с уровнем общего холестерина сыворотки, а удельная интегральная активность нейтрофила является предиктором гиперлипидемии.

Впервые показано, что при СКВ не происходит значительной окислительной модификации альбумина, что свидетельствует о сохранности третичной структуры белка. Показано, что концентрация ЦИК при СКВ опосредовано может быть оценена с помощью измерения триптофановой флуоресценции.

Комбинация терапии цитостатическими препаратами приводит к повышению антиоксидантной активности плазмы.

Практическая значимость

Полученные данные расширяют представления о роли оксидативного стресса при СКВ и могут служить основой для дальнейшего изучения вклада нарушения оксидативного статуса в патогенез самого заболевания и развитие сердечно-сосудистых осложнений.

Предложены новые методы оценки оксидативного стресса в крови больных СКВ: определение антиоксидантной активности плазмы и функциональной активности нейтрофилов с помощью кинетической люминол-активированной хемилюминесценции с двухстадийной стимуляцией, определение содержания окислительной модификации альбумина с помощью спектрофлуориметрии.

Данные методики могут быть использованы в дальнейших исследованиях клинического

значения нарушения оксидативного статуса в развитие сердечно-сосудистых осложнений у больных СКВ.

Применение удельной интегральной активности нейтрофила, отражающей его функциональную активность, имеет клиническое значение для прогнозирования раннего развития атеросклероза, и, следовательно, для своевременной компенсации гиперлипидемии и предупреждения возникновения сердечно-сосудистых осложнений.

Повышение антиоксидантной активности плазмы крови при назначении цитостатиков свидетельствует об их протективном эффекте в отношении развития гиперлипидемии и, следовательно, сердечно-сосудистых осложнений.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У больных СКВ, по сравнению со здоровыми донорами, отмечается активация нейтрофильного звена оксидативного стресса.
2. При СКВ не нарушается транспортная функция альбумина поскольку не отмечена системная окислительная модификация его молекулы.
3. Антиоксидантная активность плазмы крови больных СКВ повышена, при этом её уровень коррелирует с лечением цитостатическими препаратами. Комбинированная терапия цитостатиками и кортикостероидами, по сравнению с монотерапией кортикостероидами, повышает антиоксидантную активность плазмы крови, что является аргументом в пользу самостоятельного влияния цитостатиков на антиоксидантные свойства плазмы крови.
4. Показатели оксидативного статуса отражают выраженность воспалительных реакций: коэффициент затухания респираторного взрыва нейтрофилов коррелирует с уровнем СОЭ, удельная спонтанная активность нейтрофила снижается по мере возрастания активности процесса у больных с поражением почек.
5. ИЛ-1 β определяет активированное и праймированное состояние нейтрофилов при СКВ.
6. Триптофановая флуоресценция отражает концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), концентрацию антител к ДНК, а также тяжесть заболевания (развитие висцеритов).
7. Удельная интегральная и пиковая активность нейтрофила коррелируют с концентрацией общего холестерина, и представляют значение при прогнозировании развития гиперлипидемии.

Апробация работы

Апробация диссертационной работы состоялась 27 июня 2017 г. на совместном заседании кафедры внутренних болезней Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии медико-профилактического факультета Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Результаты диссертационной работы были доложены на 16ой Международной конференции «Питание и диагностика» (Прага, Чешская республика, октябрь 2015), VIII Международной научной конференции SCIENCE4HEALTH2017 (Москва, апрель 2017).

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и их внедрения в практику.

Внедрение в практику

Результаты исследования используются в работе нефрологического и ревматологического отделений Университетской клинической больницы № 3 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова; внедрены в практику преподавания курса внутренних болезней студентам Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и Первого МГМУ имени И.М. Сеченова.

Выражаю глубокую благодарность за повседневную помощь в работе над диссертацией научному руководителю академику РАН, профессору Н.А. Мухину. Сердечно признательна за помощь в работе и ценные консультации к.м.н., доценту кафедры внутренних болезней Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Т.Н. Красновой; к.х.н., доценту кафедры медицинской биофизики Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова Е.В. Проскурниной; рецензентам – д.м.н., профессору кафедры внутренних болезней Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Моисееву С.В., к.м.н., ассистенту кафедры внутренних болезней Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Георгиновой О.А., а также всему коллективу Клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева. Автор благодарит за плодотворное сотрудничество коллектив лаборатории кафедры медицинской биофизики Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (зав. – академик РАН, профессор, д.б.н., Владимиров Ю.А.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, в журналах, включенных в перечень Высшей аттестационной комиссии.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, приложений и списка литературы, иллюстрирована 1 таблицей и 12 рисунками. Библиография включает 177 источников (5 – отечественных и 172 – зарубежных).

База проведения

Работа выполнена на кафедре внутренних болезней Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, в Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева Первого МГМУ имени И.М. Сеченова и научно-исследовательской лаборатории кафедры медицинской биофизики Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (зав. лабораторией академик РАН, проф. Ю.А. Владимиров, научный консультант – к.х.н., доцент кафедры медицинской биофизики МГУ имени М.В. Ломоносова, Проскурнина Елена Васильевна).

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материал и методы исследования

В проспективное исследование были включены 53 больных СКВ в возрасте от 17 до 64 лет, из них 10 мужчин и 43 женщины, которые наблюдались в Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных заболеваний имени Е.М. Тареева Первого МГМУ имени И.М. Сеченова с 2014 по 2017 гг. (директор д.м.н., профессор, академик РАН, Н.А. Мухин). Средний возраст группы составлял 34,2 (11,5) лет. Абсолютными критериями исключения являлись: острый инфекционный процесс, обострение хронических воспалительных заболеваний, онкологические заболевания, алкогольная болезнь, беременность.

Группой контроля служили здоровые доноры Гематологического научного центра МЗ РФ ($n = 87$), сопоставимые с больными по полу и возрасту.

На момент исследования все больные были разделены на 3 группы: с преимущественным поражением внутренних органов ($n = 33$ человек), с периферическим вариантом заболевания ($n = 11$ человек) и ремиссия процесса констатирована у 9 человек. Согласно классификации И.Е. Тареевой, больные с поражением почек были разделены на группы с активным волчаночным

нефритом (ВН) с нефротическим синдромом ($n = 8$), активным ВН без нефротического синдрома ($n = 20$) и группу с неактивным ВН ($n = 12$). Больных с быстро прогрессирующим течением заболевания не было.

У большинства больных отмечали признаки активности заболевания разной степени выраженности: с выраженной активностью ($n = 12$ больных) (индекс SLEDAI-2K 11 баллов и более), с умеренной ($n = 10$) (индекс SLEDAI-2K 5–10 баллов), с низкой активностью ($n = 25$) (индекс SLEDAI-2K менее 5 баллов) и больные в ремиссии ($n = 6$) (индекс SLEDAI-2K 0 баллов). У 10 больных был высокий индекс повреждения органов (индекс SDI 4 и более), у 28 больного с минимальным повреждением индекс SDI был менее 3 и у 15 больных признаков повреждения органов не было.

Все больные получали иммуносупрессивную терапию: из них 12 активную иммуносупрессивную терапию цитостатиками и глюкокортикостероидами в сверхвысоких дозах и 41 больной получал поддерживающую терапию: монотерапию ГКС или ГКС в сочетании с цитостатиками (азатиоприн, препараты микофеноловой кислоты, метотрексат).

Обследование больных включало сбор жалоб, данных анамнеза, объективного обследования и стандартных лабораторных и инструментальных методов.

Для исследования показателей оксидативного статуса проводили забор венозной крови. Определяли следующие параметры: антиоксидантная активность (АОА) плазмы крови, удельная пиковая активности нейтрофила A_1^* , удельная интегральная активность нейтрофила S^* , коэффициент затухания респираторного взрыва K_d , удельная спонтанная хемилюминесценция нейтрофила $A_{сп}^*$ (базальной радикал-продуцирующей активности нейтрофила) (Рис. 1). Проводили определение доли окисленного альбумина методом флуоресценции после предварительного удаления из плазмы свободных иммуноглобулинов и ЦИК.

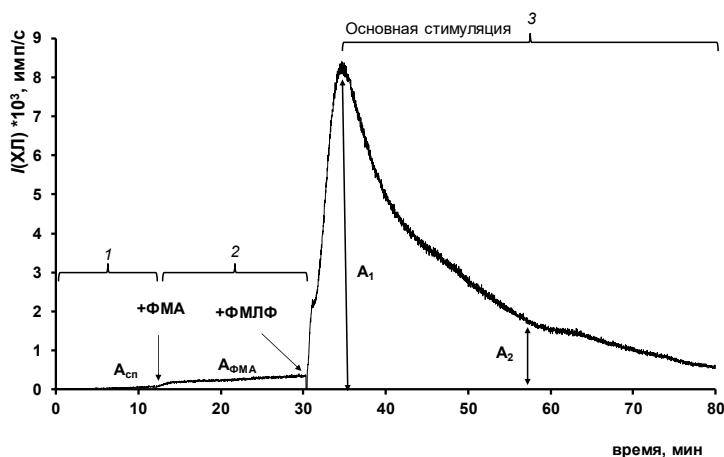


Рисунок 1. Типичная кривая кинетики реакции ХЛ в ответ на двойную стимуляцию нейтрофилов: (1) — спонтанная ХЛ, (2) — предварительная стимуляция ФМА, (3) — основная стимуляция ФМЛФ. Стрелками обозначены моменты добавления стимулов (Проскурнина Е.В. и соавт, 2016).

Для исследования функции нейтрофилов *in vitro* проводилось воздействие на них естественными стимулами: филграстимом (гранулоцит-колониестимулирующий фактор, стимулятор лейкопоэза) и беталейкином (рекомбинантный ИЛ-1 β).

Оценка антиоксидантного потенциала используемых препаратов (преднизолона и метотрексата) производилась на основе определения АОА методом кинетической люминол-активированной хемилюминесценции использовали препараты. С этой целью *in vitro* в систему, генерирующую радикалы, состоящую из фосфатного буфера, АБАП и люминола, объёмом 990 мкл, добавляли 10 мкл раствора 5 мг каждого препарата в 10 мл фосфатного буфера. Конечная концентрация препарата в кювете составила 5,0 мг/л, что по порядку величины соответствует концентрации препарата в плазме крови при дозировке 25 мг, с учетом биодоступности препарата.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета STATISTICA 13.1 (StatSoft, США). Для изучения связи между данными использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена или параметрический корреляционный метод Пирсона. Достоверность различия между двумя группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни или параметрического критерия Стьюдента. Для анализа различия между несколькими группами применяли параметрический дисперсионный анализ или непараметрический метод сравнения Краскела-Уоллиса.

Поиск параметров, позволяющих прогнозировать динамику развития заболевания, осуществляли с помощью бинарной логистической регрессии. Вероятность наступления события оценивали в зависимости от значения независимых переменных (показателей

оксидативного стресса отдельно и в сочетании с клинико-лабораторными параметрами). Вероятность наступления события вычисляли с помощью формулы:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}}, \text{ где } z = b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + \dots + b_n \times X_n + a.$$

X_i – значение независимой переменной, характеризующей объясняющий признак (фактор риска), b_i и a – регрессионный коэффициент и некоторая константа, соответственно, полученные в результате логистического регрессионного анализа.

Во всех случаях различия признавали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование функциональной активности нейтрофилов под действием искусственных стимулов

При сравнении больных СКВ с группой контроля оказалось, что для больных СКВ характерна более высокая удельная пиковая активность нейтрофилов A_1^* . Выявленные различия статистически значимы ($p < 0,0001$) (Рис. 2).

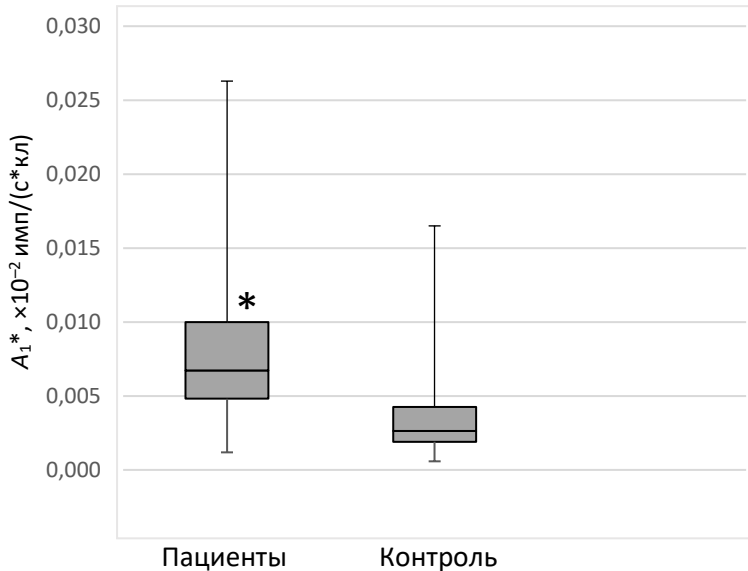


Рисунок 2. Удельная пиковая активность нейтрофила A_1^* в группе пациентов и группе контроля, $*p < 0,05$

У больных СКВ также статистически значимо более выражена удельная интегральная активность нейтрофила S^* , по сравнению с группой контроля ($p < 0,0001$) (Рис. 3).

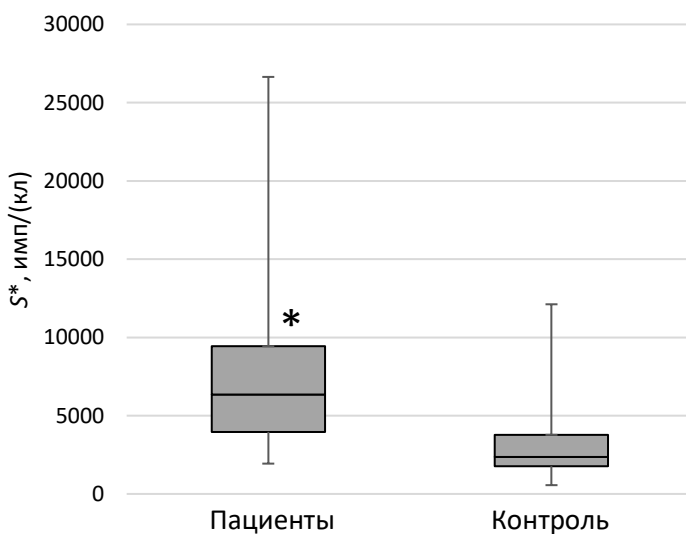


Рисунок 3. Удельная интегральная активность нейтрофила S^* в группе пациентов и группе контроля, $*p < 0,05$

Также у больных СКВ удельная спонтанная хемилюминесценция нейтрофила достоверно выше, чем в группе контроля ($p < 0,0001$) (Рис. 4).

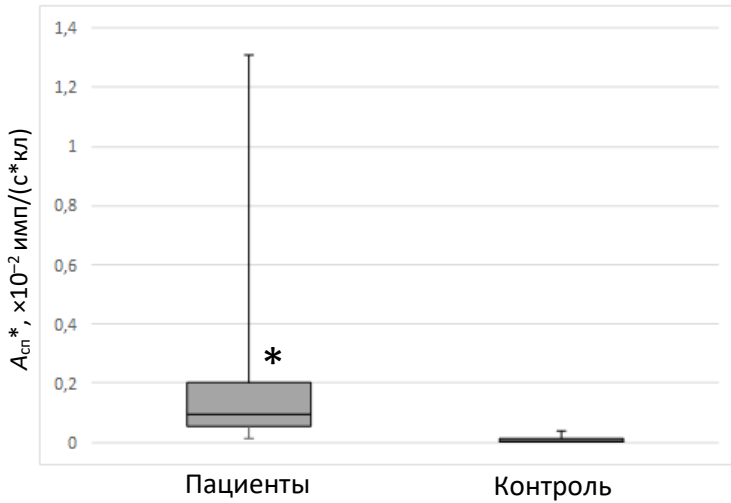


Рисунок 4. Удельная спонтанная хемилюминесценция нейтрофила в группе пациентов и группе контроля, * $p < 0,05$

Отличий при оценке коэффициента затухания респираторного взрыва нейтрофилов между группой больных и группой контроля не было обнаружено.

Исследование доли окисленного альбумина

После предварительного отделения ЦИК с помощью методики с применением ПЭГ-6000 провели измерение доли окисленного альбумина (ДОА) методом флуоресцентного анализа ($n = 53$). Между группой больных СКВ и группой контроля не обнаружено статистически значимого отличия: результаты, полученные для группы больных (средняя ДОА 24%, $s = 18\%$) сопоставимы с таковыми для группы контроля (средняя ДОА 24%, $s = 16\%$), $p = 0,35$ (критерий Манна-Уитни). Следовательно, можно сделать вывод, что при СКВ альбумин не претерпевает значительной окислительной модификации, что свидетельствует о сохранности третичной структуры белка.

Исследование антиоксидантной активности плазмы крови

У больных СКВ АОА плазмы крови была выше, по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0059$). Значения $S(AOA)$ (медиана и интерквартильный размах) составили для группы больных – $315 \cdot 10^3$ имп ($200 \cdot 10^3 - 480 \cdot 10^3$), для группы контроля $220 \cdot 10^3$ имп ($190 \cdot 10^3 - 260 \cdot 10^3$) (Рис.5).

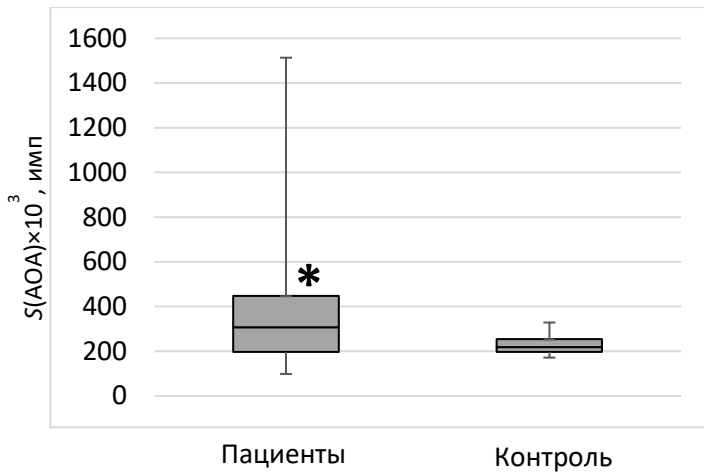


Рисунок 5. АОА плазмы крови в группе пациентов и группе контроля, $*p < 0,05$

Корреляционный анализ не подтвердил наличия связи между уровнем АОА и концентрацией мочевой кислоты (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,02$, $p = 0,86$, n анализируемых пар = 53).

Для определения влияния цитостатиков на АОА плазмы крови сравнивали группы больных, получавших комбинированную терапию цитостатиками и ГКС ($n = 25$), и больных, получавших монотерапию ГКС ($n = 28$).

В группе больных, получавших комбинированную терапию ГКС с цитостатиками, обнаружено статистически значимое увеличение АОА плазмы крови ($p = 0,037$ для критерия Манна-Уитни) (Рис. 6).

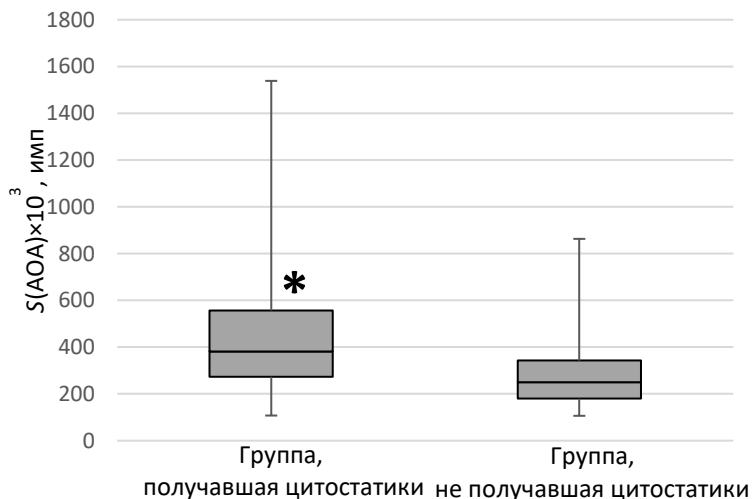


Рисунок 6. АОА плазмы крови в группах пациентов, получавших и не получавших лечение цитостатиками, $*p < 0,05$

Для подтверждения версии об антиоксидантных эффектах ЦС, на ми было проведено исследование *in vitro*.

В исследовании *in vitro* с помощью методики, основанной на подавлении хемилюминесценции в системе, генерирующей свободные радикалы водным раствором

препарата соответствующей концентрации, АОА преднизолона составила $14,8 \pm 0,5$ мкМ, а АОА метотрексата = $3,6 \pm 0,1$ мкМ в единицах концентрации аскорбата натрия. Таким образом, совокупность клинических и лабораторных данных позволяет говорить о наличии антиоксидантных свойств у ГКС и ЦС. Следовательно, можно предположить, что повышение АОА плазмы крови при терапии цитостатиками связано как с их собственной АОА, так и с их способностью вызывать гиперурикемию (эндогенный антиоксидант).

Исследование связи иммуновоспалительной реакции и поражения внутренних органов с нарушением оксидативного статуса

У больных СКВ с поражением и без поражения внутренних органов показатели радикал-продуцирующей активности нейтрофилов не отличались. Однако при анализе больных СКВ с волчаночным нефритом (ВН) было обнаружено снижение удельной спонтанной активности нейтрофила у больных активным ВН с нефротическим синдромом (НС) по сравнению с больными активными формами ВН без НС ($p = 0,045$) (Рис.7).

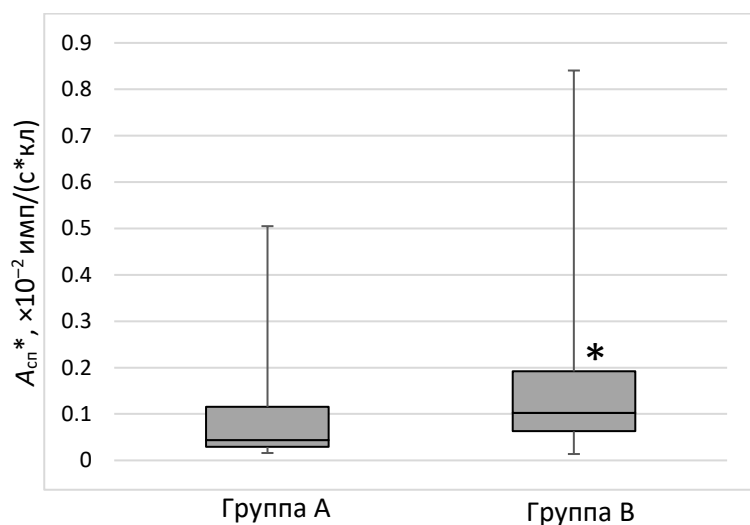


Рисунок 7. Удельная спонтанная активность нейтрофила в группе с активным ВН с НС (Группа А) и группе с активными формами нефрита без НС (Группа В), * $p < 0,05$

У больных с различной степенью активности заболевания, оцененной с помощью индекса SLEDAI, показатели функциональной активности нейтрофилов статистически значимо не отличались.

В группах больных СКВ с различным повреждением органов: значительным, минимальным или его отсутствием, оцененным с помощью индекса SDI, также не было отмечено статистически значимых отличий исследуемых параметров.

Между больными СКВ, получающими активную иммуносупрессивную терапию и поддерживающее лечение, не было обнаружено статистически значимого отличия.

В объединённой выборке больных была выявлена корреляция коэффициента затухания респираторного взрыва нейтрофилов с уровнем СОЭ (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,36$, $p = 0,02$, n анализируемых пар = 53).

Корреляции показателей функциональной активности нейтрофилов с другими параметрами, отражающими иммунологическую активность заболевания (СРБ, фибриноген, антитела к ДНК, компоненты системы комплемента) не были обнаружены.

В соответствии с предположением о праймированном цитокинами состоянии нейтрофилов, при котором происходит увеличение их потенциальной функциональной активности, обеспечивающим переход с начального уровня с низкой скоростью протекания биохимических процессов в активированное состояние, проведено воздействие естественными стимулами (ИЛ-1 β , ГКС-Ф) на нейтрофилы образцов крови 5 больных. На первом этапе при сравнении со здоровыми донорами в ответ на стимуляцию только ИЛ-1 β во всех случаях наблюдали выраженный хемилюминесцентный ответ нейтрофилов (вид типичной кривой представлен на Рис. 7; \bar{A}_1^* доноров = $2,52 \times 10^3$, имп/с ($n = 6$), \bar{A}_1^* больных СКВ = $4,53 \times 10^3$, имп/с ($n = 6$); $p < 0,05$). При предварительной стимуляции ИЛ-1 β отмечали двухфазное праймирующее действие этого цитокина после воздействия основного стимула ФМЛФ, при этом у здоровых доноров данный эффект был выражен слабо (Рис. 7). Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных СКВ ИЛ-1 β является как выраженным стимулом, так и праймирующим агентом.

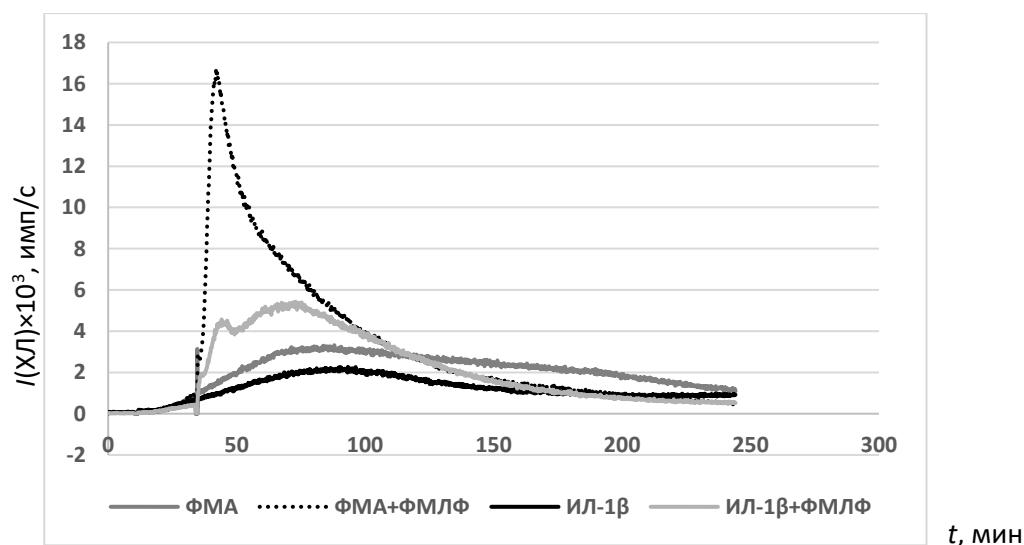


Рисунок 8. Хемилюминесцентный ответ нейтрофилов крови больного СКВ С. на стимуляцию ФМА, ФМА+ФМЛФ, ИЛ-1 β , ИЛ-1 β + ФМЛФ.

При стимуляции ГКС-Ф были получены сопоставимые эффекты в группе здоровых и больных (\bar{A}_1^* доноров = $1,12 \times 10^3$, имп/с ($n = 6$), \bar{A}_1^* больных СКВ = $1,27 \times 10^3$, имп/с ($n = 6$); $p = 0,13$).

При исследовании связи иммуновоспалительной реакции и поражения внутренних органов с долей окисленного альбумина обнаружено, что уровень общей триптофановой флуоресценции безглобулиновой плазмы крови отражает содержание в ней ЦИК. Параметр рассчитывают следующим образом: $\text{Trp}^*(\text{САЧ}+\text{ЦИК}) = I^*_{\text{тр реал}}/I_{0 \text{ тр теор}}$, где $I^*_{\text{тр реал}}$ — интенсивность флуоресценции безглобулиновой плазмы при 353 нм ($\lambda_{\text{ex}}=260$ нм), $I_{0 \text{ тр теор}}$ — интенсивность флуоресценции триптофана, соответствующая концентрации альбумина, определенной биохимическим методом. Таким образом, он может быть использован в качестве экспрессного показателя, отражающего общую триптофановую флуоресценцию образца плазмы крови, зависящую от количества остатков триптофана, содержащихся в ЦИК и альбумине.

Уровень триптофановой флуоресценции безглобулиновой плазмы крови, отражающей интенсивность образования ЦИК, значимо выше в группе с поражением внутренних органов ($n = 33$, среднее Trp^* 2,21, $s = 0,53$), по сравнению с группой без поражения внутренних органов ($n = 20$, среднее Trp^* 1,83, $s = 0,60$) ($p = 0,032$); в группе пациентов с активным ВН ($n = 28$, среднее Trp^* 2,24, $s = 0,55$), по сравнению с пациентами без поражения почек ($p = 0,030$); коррелирует с концентрацией антител к ДНК (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,39$, $p = 0,008$, n анализируемых пар = 53) ($p = 0,008$) и значимо выше в группе получающих активную иммуносупрессивную терапию ($n = 12$, среднее Trp^* 2,43, $s = 0,58$), по сравнению с группой, получающей поддерживающую терапию ($n = 41$, среднее Trp^* 1,96, $s = 0,53$) ($p = 0,01$).

Проведено исследование связи иммуновоспалительной реакции и поражения внутренних органов с уровнем АОА плазмы крови. При сопоставлении АОА плазмы крови между группами больных СКВ с различной выраженностью повреждения внутренних органов и активности заболевания статистически значимого отличия обнаружено не было. При сравнении групп больных СКВ, разделенных в зависимости от наличия поражения внутренних органов, а также характера поражения почек, также не было обнаружено статистически значимого отличия.

Исследование частоты сердечно-сосудистых заболеваний и гиперлипидемии в группе больных СКВ

Частота сердечно-сосудистых осложнений в исследуемой группе составила 13,2% (7 больных из них 3 больных с атеросклерозом периферических артерий, 1 больной с цереброваскулярной болезнью, атеросклерозом сонных артерий, 2 больных с ИБС, 1 больной с ИМ),

гиперлипидемия (повышение общего холестерина (6,0 (2,1)) или триглицеридов (2,2 (1,4)) отмечена у 36% обследованных больных, что значимо выше чем в популяции в целом, при том что возраст выборки составил 34,2 (11,5) года.

Проведен анализ корреляции показателей функциональной активности нейтрофилов (удельного уровня спонтанной ХЛ, удельной пиковой активности нейтрофила, удельной интегральной активности нейтрофила и коэффициента затухания респираторного взрыва) у больных СКВ с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний: возраста, длительности заболевания, уровня артериальной гипертензии, показателей липидного спектра (ЛПВП, ЛПНП, триглицериды, общий холестерин), СРБ, СОЭ.

В группе больных СКВ была выявлена положительная корреляционная связь удельной интегральной активности нейтрофила с концентрацией общего холестерина сыворотки крови (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,35$, $p = 0,03$, n анализируемых пар = 53) (Рис. 8), а также положительная корреляционная связь удельной пиковой активности нейтрофила с концентрацией общего холестерина сыворотки крови (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,41$, $p = 0,009$, n анализируемых пар = 53) (Рис. 9).

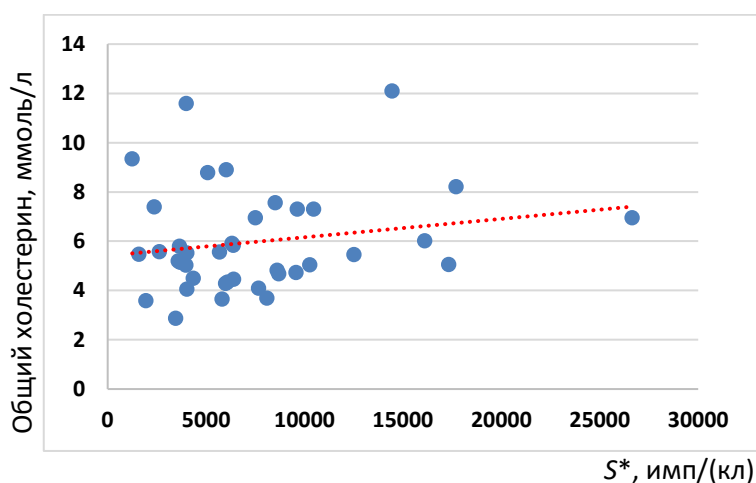


Рисунок 9. Корреляция удельной интегральной активности нейтрофила с концентрацией общего холестерина сыворотки крови.

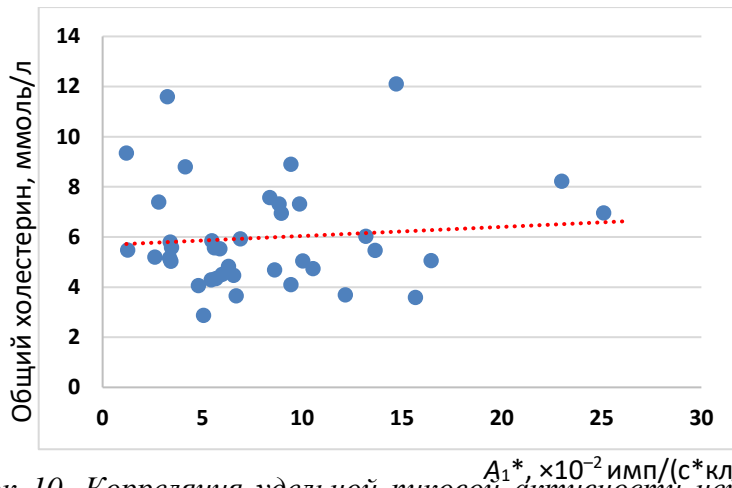


Рисунок 10. Корреляция удельной пиковой активности нейтрофила с концентрацией общего холестерина сыворотки крови.

Для остальных факторов сердечно-сосудистого риска (возраст, длительность заболевания, уровень артериальной гипертензии, ЛПВП, ЛПНП, триглицериды, СРБ, СОЭ) результаты статистического анализа показали отсутствие значимой корреляции с показателями функциональной активности нейтрофилов.

При оценке прогностического значения показателей функциональной активности нейтрофилов была исследована зависимость качественного бинарного признака (наличие или отсутствие повышения уровня общего холестерина сыворотки крови; наличие или отсутствие гиперлипидемии) от независимых переменных (стандартных клинико-лабораторных показателей и показателей функциональной активности нейтрофилов) с помощью бинарной логистической регрессии.

Оценивали индивидуальное значение каждого из показателей функциональной активности нейтрофилов:

- удельный уровень спонтанной ХЛ нейтрофила
- удельная пиковая активность нейтрофила
- удельная интегральная активность нейтрофила
- коэффициент затухания респираторного взрыва

Также провели оценку значимости вышеуказанных параметров в сочетании со следующими стандартными клинико-лабораторными показателями:

- концентрация фибриногена в плазме крови
- уровень СОЭ
- уровень СРБ

Для всех больных, включённых в исследование, рассчитывали вероятность (P) одного из событий (наличие или отсутствие повышения уровня общего холестерина сыворотки крови; наличие или отсутствие гиперлипидемии) на основе одного из показателей функциональной

активности нейтрофилов, как независимой переменной. Вероятность наступления события рассчитывали по формуле:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}}, \text{ где } z = b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + \dots + b_n \times X_n + a.$$

X_i – значение независимой переменной, характеризующей объясняющий признак (фактор риска), b_i и a – регрессионный коэффициент и некоторая константа, соответственно, полученные в результате логистического регрессионного анализа.

Были исследованы 12 уравнений бинарной логистической регрессии. В уравнении, где в качестве независимой переменной выступали значения удельной интегральной активности нейтрофила, корреляция наличия фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний (наличие гиперлипидемии) со значением независимой переменной оказалась статистически значимой, получены следующие значения регрессионного коэффициента и соответствующей константы: $b_1 = 1,244$ ($p = 0,039$), $a = - 2,313$ ($p = 0,049$).

Следовательно, вероятность развития гиперлипидемии можно рассчитать с помощью уравнения:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}}, \text{ где } z = 1,244 \times [S^*] - 2,313$$

ВЫВОДЫ

1. У больных СКВ по сравнению со здоровыми донорами отмечается активация нейтрофильного звена оксидативного стресса, что проявляется повышением показателей функциональной активности нейтрофилов: увеличением удельной пиковой активности нейтрофила, удельной интегральной активности нейтрофила S^* , удельного уровня спонтанной ХЛ ($p < 0,0001$). При этом степень окислительной модификации альбумина плазмы крови в группе больных СКВ была сопоставима с группой здоровых доноров ($p = 0,35$), что говорит о сохранности третичной структуры белка.
2. У больных СКВ антиоксидантная активность плазмы крови выше по сравнению с группой контроля ($p = 0,0059$). Комбинированная терапия цитостатиками и кортикостероидами, по сравнению с монотерапией кортикостероидами повышала антиоксидантную активность плазмы крови.
3. Выявлена взаимосвязь нарушения оксидативного статуса с выраженностью воспалительных реакций: обнаружена корреляция коэффициента затухания респираторного взрыва нейтрофилов с уровнем СОЭ ($r = 0,36, p = 0,02$); показано, что интерлейкин- 1β для нейтрофилов при СКВ является как выраженным стимулом, так и праймирующим агентом. У больных с тяжелым поражением почек по мере возрастания активности процесса (наличие активного ВН с НС по сравнению с больными с активными формами ВН без НС, неактивными формами нефрита и без поражения почек) отмечалось снижение удельной спонтанной активности нейтрофила ($p = 0,045$).
4. Уровень триптофановой флуоресценции безглобулиновой плазмы крови, отражающей интенсивность образования ЦИК, значимо выше в группе с поражением внутренних органов, по сравнению с группой без поражения внутренних органов, $p = 0,032$; в группе пациентов с активным ВН, по сравнению с пациентами без поражения почек, $p = 0,030$; а также коррелирует с концентрацией антител к ДНК ($p = 0,008$) и значимо выше в группе получающих активную иммуносупрессивную терапию, по сравнению с группой, получающей поддерживающую терапию, $p = 0,01$.
5. Частота сердечно-сосудистых осложнений у обследованных больных СКВ составила 13,2%, гиперлипидемия отмечена у 36%, что значимо выше чем в популяции в целом, при том что возраст выборки составил 34,2 (11,5) года. Установлена связь между концентрацией общего холестерина и удельной интегральной ($r = 0,35, p = 0,03$) и пиковой активностью нейтрофила ($r = 0,41, p = 0,009$). При проведении регрессионного анализа для прогнозирования развития гиперлипидемии подтверждена значимость удельной интегральной и пиковой активности нейтрофила [$b_1 = 1,244 (p = 0,039)$, $a = - 2,313 (p = 0,049)$].

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Исследование показателей удельной интегральной и пиковой активности нейтрофилов важно для прогнозирования признаков развития раннего атеросклероза.
2. Использование цитостатиков увеличивает АОА плазмы крови, что может оказывать протективный эффект на развитие гиперлипидемии и связанных с ней осложнений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Статьи в журналах:**

1. **Смирнова Е.В.**, Краснова Т.Н., Проскурнина Е.В. Особенности функционального статуса нейтрофилов у больных волчаночным нефритом // *Здоровье и здравоохранение в 21 веке*, 2017. – № 12 – С. 82-89.
2. **Смирнова Е.В.**, Краснова Т.Н., Проскурнина Е.В., Мухин Н.А. Роль дисфункции нейтрофилов в патогенезе системной красной волчанки // *Терапевтический архив*, 2017. – № 12 – С. 40-44.
3. **Смирнова Е.В.**, Созарукова М.М., Полимова А.М., Краснова Т.Н., Проскурнина Е.В. Исследование оксидативного статуса у больных системной красной волчанкой с использованием люминесцентных методов // *Технологии живых систем*, 2017. – № 4 – С. 21-31.

Тезисы конференций:

1. Proskurnina E., Polimova A., Sozarukova M., Dzhatdоеva A., Sherimova A., **Smirnova E.**, Vladimirov Y. Oxidative stress in blood: methods of diagnostics and clinical research. “16th International Nutrition & Diagnostics Conference”. Прага, Чешская республика, 03 – 06 октября 2015. (устный доклад).
2. **Smirnova E.V.**, Sozarukova M.M., Polimova A.M. New luminescent methods for oxidative stress evaluation in patients with systemic lupus erythematosus. “VIII International Scientific Conference SCIENCE4HEALTH2017”. Москва, Россия, 13 – 15 апреля 2017 (устный доклад).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АБАП – 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид
- АОА – антиоксидантная активность
- АФК – активные формы кислорода
- ВН – волчаночный нефрит
- ГКС – глюкокортикостероид
- Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДОА – доля окисленного альбумина
- ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β
- ЛПВП – липопротеины высокой плотности
- ЛПНП – липопротеины низкой плотности
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НВЛ – нейтрофильная внеклеточная ловушка
- НС – нефротический синдром
- ПЭГ-6000 – полиэтиленгликоль-6000
- САЧ – сывороточный альбумин человека
- СКВ – системная красная волчанка
- СОЭ – скорость оседания эритроцитов
- СРБ – С-реактивный белок
- ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат
- ФМЛФ – формил-метионил-лейцил-фенилаланин
- ХЛ – хемилюминесценция
- ЦИК – циркулирующий иммунный комплекс
- SDI – шкала для оценки повреждения органов, накопленного с момента начала заболевания (Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology **D**amage **I**ndex)
- SLEDAI-2K – шкала для оценки активности СКВ (Systemic Lupus **E**rythematosus **D**isease **A**ctivity **I**ndex)

Смирнова Елена Владимировна (Российская Федерация)

Роль нарушения оксидативного статуса у больных системной красной волчанкой в развитии факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний

В работе проведено исследование показателей оксидативного стресса у больных СКВ (53 человека). Результаты работы показали нарушение оксидативного статуса в виде повышения показателей функциональной активности нейтрофилов, антиоксидантной активности. При этом не было отмечено значительной окислительной модификации альбумина плазмы крови. Комбинированная терапия цитостатиками и кортикостероидами, по сравнению с монотерапией кортикостероидами повышала АОА плазмы крови. Выявлена взаимосвязь нарушения оксидативного статуса с выраженностью воспалительных реакций: обнаружена корреляция коэффициента затухания респираторного взрыва с уровнем СОЭ; показано, что ИЛ-1 β для нейтрофилов при СКВ является как выраженным стимулом, так и праймирующим агентом. У больных с тяжелым поражением почек по мере возрастания активности процесса отмечалось снижение спонтанной активности нейтрофилов. В исследованной группе установлена связь между гиперлипидемией с удельной интегральной и пиковой активностью нейтрофила. Предложена прогностическая модель оценки риска развития гиперлипидемии у больных СКВ на основании удельной интегральной активности нейтрофила.

Smirnova Elena Vladimirovna (Russian Federation)

Role of oxidative status imbalance in patients with systemic lupus erythematosus in development of cardiovascular risk factors

Oxidative stress markers were investigated in 53 patients with SLE. In patients with SLE was found increase of functional neutrophil activity. The level of blood plasma oxidatively modified albumin was unremarkable. In patients with SLE antioxidant activity of blood plasma was higher comparing to healthy controls. Combined therapy with cytostatic treatment and corticosteroids comparing to monotherapy with steroids led to increase of antioxidant activity of blood plasma. Correlation of oxidative status impairment and of inflammation was found: correlation of respiratory burst attenuation coefficient with the level of ESR; it was shown as well that in SLE interleukin-1 β for neutrophils is an obvious stimulus, as well as a priming agent. In patients with severe kidney damage decrease of spontaneous neutrophil activity was seen. Correlation between hyperlipidemia and specific integral and peak neutrophil activity was found. Prognostic model for hyperlipidemia risk assessment in patients with SLE based on specific integral neutrophil activity was developed.