

На правах рукописи

ШЕРИМОВА АИДА ЕРЖАНОВНА

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
СТАТУСА ДЛЯ ТЕЧЕНИЯ АНЦА-АССОЦИИРОВАННЫХ ВАСКУЛИТОВ**

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 им. В.А. Насоновой» Российской академии медицинских наук, доктор медицинских наук

Бекетова Татьяна Валентиновна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « » _____ 2018 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 им. 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.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Киякбаев Гайрат Калугевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Системные васкулиты ассоциированные с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ААВ) относятся к разряду сложных междисциплинарных проблем медицины. Сложность патогенетических механизмов, гетерогенность иммунологических форм и полиморфность клинических проявлений, определяют тяжесть течения, плохой прогноз и высокую смертность, а также трудности в выборе терапии. В связи с этим прогнозировать течение заболевания крайне трудно. В группу ААВ входят гранулематоз с полиангиитом (болезнь Вегенера; ГПА), микроскопический полиангиит (МПА), эозинофильный гранулематозный васкулит с полиангиитом (ЭГПА) (Бекетова Т.В., 2012; Моисеев С.В., 2014; Jennette J.C. et al., 2013).

Главная мишень аутоиммунного ответа при ААВ - нейтрофилы (Witko-Sarsat V. et al., 2009; Hao J. Et al., 2013). В результате повреждения нейтрофилов возможно за счет образования антител к миелопероксидазе - одного из ключевых активаторов окислительного стресса, страдает и их радикал-продуцирующая функция (D'Autréaux V. et al., 2007).

Генерация активных форм кислорода или азота (АФК или АФА) играет решающую роль в жизненном цикле полиморфноядерного нейтрофила. Благодаря своей высокой реактивности, эти соединения работают как антимикробные факторы, а также могут модулировать иммунный ответ. Окислительного стресс нейтрофилов проявляется респираторным взрывом.

Открытый в 2004 г. механизм антимикробного действия нейтрофилов – формирование в результате нетоза нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) состоящих из ДНК, гистонов и белков с антимикробной активностью, участвует в воспалительных и аутоиммунных процессах. (Brinkmann V. et al., 2004). Генерация АФК играет решающую роль в формировании НВЛ. С другой же стороны, большое число свободных радикалов в свою очередь могут участвовать в развитии вторичного воспаления, как это хорошо продемонстрировано при таких заболеваниях как сахарный диабет, атеросклероз (Pitocco D. et al., 2013).

При этих заболеваниях показана неблагоприятная роль продуктов окисления липидов и белков в повреждении сосудистой стенки из-за развития вторичного воспаления, инициированного окислительным стрессом, что играет важную патогенетическую роль в развитии сосудистых катастроф.

Таким образом, можно предположить, что первичное повреждение нейтрофилов при ААВ существенным образом меняет функцию нейтрофилов, что может приводить, в том числе, и к глубоким нарушениям окислительного статуса, способного, в свою очередь, самостоятельно повреждать сосудистую стенку и поддерживать воспалительные процессы. Вместе с тем глубина окислительного стресса определяется и состоянием антиоксидантной активности плазмы крови и степенью окислительной модификации альбумина

– основной мишени АФК в крови. Изменение третичной формы альбумина в результате окисления может изменять его транспортную функцию, что в конечном итоге может влиять на результаты лечения. Стабильность окислительно-восстановительных процессов прогностически важна для достижения ремиссии заболевания. В связи с этим, очевидна целесообразность комплексной оценки функционального статуса нейтрофилов путем изучения их суммарной активности.

Одним из надежных методов ее оценки является хемилюминисценция, активированная различными стимулами, позволяющая производить комплексную оценку нарушений окислительного статуса.

Цель исследования: изучить роль нарушения окислительного статуса в патогенезе АНЦА-ассоциированных васкулитов и уточнить его прогностическую значимость для течения заболевания.

Задачи исследования

1. Оценить радикал-продуцирующую способность нейтрофилов у больных ААВ и СД 2 типа.
2. Определить значимость окисленной модификации альбумина для уточнения степени окислительного стресса при ААВ.
3. Изучить антиоксидантную активность при ААВ и СД 2 типа.
4. Сопоставить показатели окислительного стресса с особенностями клинической картины ААВ.
5. Изучить вклад внутри и внеклеточной радикал - продуцирующей способности нейтрофила в нарушение окислительного статуса и прогноз для течения заболевания.

Научная новизна

Впервые в рамках одного исследования на основе новых хемилюминесцентных методик произведена комплексная оценка показателей окислительного стресса у пациентов с ААВ: функциональной активности главного источника свободных радикалов крови — нейтрофильных гранулоцитов; антиоксидантной системы плазмы крови; окислительной модификации сывороточного альбумина.

Впервые оценен вклад внутри и внеклеточной продукции свободных радикалов нейтрофилами в формирование клинической картины заболевания.

На основе сравнительного анализа окислительного статуса у больных ААВ и СД 2 типа впервые продемонстрировано определяющее значение первичного повреждения нейтрофилов и потери их функции в патогенезе и формировании особенностей клинической картины заболевания.

Впервые в качестве предикторов наряду с клинико-лабораторными признаками использованы данные математического моделирования функции нейтрофилов, что позволило уточнить прогноз ААВ и выявить больных с

наиболее неблагоприятным течением болезни, развитием необратимых изменений и высоким риском вторичных инфекций.

Практическая значимость

Показатели окислительного стресса в практике позволяют уточнить степень повреждения сосудов и выраженность воспалительных реакций, что позволяет более точно определить прогноз течения ААВ.

Больные с дефектом внутриклеточной радикал-продуцирующей активности нейтрофила имеют высокий риск развития вторичной инфекции и возможно нуждаются в превентивном лечении антибактериальными препаратами.

Степень нарушения окислительных реакций и антиоксидантная активность являются демонстрацией глубины нарушения патологических процессов, но не являются специфичными, поэтому могут быть применены для прогнозирования течения других заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Собственная и стимулированная радикал-продуцирующая способность нейтрофилов у больных ААВ повышена по сравнению с группой здоровых доноров и больных СД 2 типа.

2. Повышение доли окисленного альбумина у пациентов с ААВ по сравнению с группой здоровых доноров и СД 2 типа свидетельствует о роли системного окислительного стресса, затрагивающего белковое звено.

3. Антиоксидантная активность у больных ААВ выше антиоксидантной активности здоровых доноров и ниже, чем у больных СД 2 типа.

4. Показатели нарушения окислительного статуса ассоциируются с клиническими особенностями ААВ.

5. Математическое моделирование функции нейтрофилов демонстрирует важное предикторное значение нарушения окислительного статуса для течения ААВ.

Внедрение результатов работы в практику

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

Апробация работы

Апробация диссертационной работы проведена 27 июня 2017 года на совместном заседании сотрудников кафедры внутренних болезней факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Материалы диссертации были представлены на

конференциях: «Ломоносов - 2016» (Москва 2016 г.), «SCIENCE4HEALTH-2016» (Москва, 2016 г.)

Публикации

По теме диссертации опубликованы 3 печатные работы в отечественных изданиях, в том числе в журналах, включенных в перечень ВАК.

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.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 86 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственного исследования, их обсуждения, выводов и практических рекомендаций, содержит 9 рисунков и 15 таблиц. Список литературы содержит 116 источников, среди них 15 отечественных.

База проведения

Клиническое исследование проводилось на базе клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева Первого МГМУ имени И.М.Сеченова (директор клиники академик РАН, профессор Н.А. Мухин). Лабораторная часть выполнялась на кафедре медицинской биофизики Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (зав. Кафедрой академик РАН, проф. Владимиров Ю.А., консультант к.х.н., доц. Е.В.Проскурнина).

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

В проспективное исследование были включены 40 больных с АНЦА ассоциированными системными васкулитами (ААВ). Среди них было 30 мужчин и 10 женщин в возрасте 18–80 лет. Гранулематоз с полиангиитом (ГПА) был у 31 больного, микроскопический полиангиит (МПА) у 5 больных, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ЭГПА) у 4 больных. АНЦА положительными были 18 больных, АНЦА отрицательными были 11 больных, у остальных АНЦА не определялись. Все больные наблюдались в Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных заболеваний имени Е.М. Тареева Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (директор профессор, академик РАН Н.А.Мухин) с 2012 по 2015 гг. Диагноз устанавливался согласно рекомендациям Конференции в Чапел-Хилле (2012г.).

Критериями для включения в исследование были установленный диагноз АНЦА-ассоциированного васкулита и подписанное информированное согласие.

Критериями исключения являлись: онкологические заболевания, алкогольная болезнь.

Группа сравнения состояла из двух подгрупп: в 1-ю вошли 50 больных сахарным диабетом 2 типа, которые наблюдались в городской поликлинике №2 г. Москвы, вторая группа была представлена 90 практически здоровыми донорами.

Обследование больных проводилось по стандартам для больных васкулитами и включало в себя изучение анамнеза, физического обследования, лабораторных и инструментальных методов.

Наряду с общим анализом крови, общим анализом мочи, биохимическими параметрами (общий белок, альбумин, липидный обмен, глюкоза, гликированный гемоглобин, креатинин, мочевая кислота, фибриноген, С-реактивный протеин), больным васкулитами исследовались АНЦА – к протеиназе-3 (ПР-3) и миелопероксидазе (МПО) методом иммуноферментного анализа.

Активность васкулита оценивали с использованием индекса активности BVAS (*Birmingham Vasculitis Activity Score, version 3.0*). Для каждого пациента заполняли форму BVAS.

Тяжесть необратимого поражения органов оценивали с помощью индекса VDI (*Vasculitis Damage Index*). Для каждого пациента заполняли форму VDI.

При анализе течения болезни выделяли локальный (поражение верхних дыхательных путей, органа зрения и слуха) и генерализованный (поражение верхних дыхательных путей, органа зрения и слуха в сочетании с поражением легких и/или почек, а также желудочно-кишечного тракта, нервной системы, кожи) варианты.

В зависимости от активности выделяли несколько фаз заболевания.

Ремиссия — отсутствие признаков активности (общий счет 0-1 балл) при нормальном содержании в крови СРБ на фоне стабильной поддерживающей терапии.

Частичная ремиссия — уменьшение на фоне лечения общей суммы баллов на 50% от первоначальной.

Низкая активность (персистирующая активность) - персистенция общих симптомов воспаления (артралгии, миалгии и др.), которые купируются незначительным повышением дозы глюкокортикоидов (эскалации терапии не требуется).

Неактивная фаза — ремиссия, в период которой нет необходимости в поддерживающей терапии.

«Большое» обострение — вовлечение в воспалительный процесс жизненно важных органов и систем (легких, почек, ЦНС, сердечно-сосудистой системы), и увеличение общей суммы баллов на 6 и более.

«Малое» обострение — возобновление симптомов заболевания с увеличением общей суммы с 0–1 до 5 баллов; требуется повышение дозы ГКС до 30 мг/сут.

На момент исследования окислительного статуса у большинства больных ААВ отмечались признаки активности болезни разной степени выраженности: с выраженной активностью — 9 больных (индекс BVAS 11-21), с умеренной активностью — 18 (индекс BVAS 3–10) и больные в ремиссии — 13 (индекс BVAS 0–2). Пациентов с генерализованной формой болезни было 31, с локальной — 9. Иммуносупрессивную индукционную или поддерживающую ремиссию терапию получали 35 больных и 5 больных не получали медикаментозную терапию.

Для оценки окислительного статуса использовались специальные методы.

- Определение антиоксидантной активности плазмы крови проводилось методом кинетической хемилюминесценции в модификации (Алексеев А.В., 2012) основанной на регистрации и обработке полной кривой развития ХЛ во времени.

- Оценка функциональной активности нейтрофильного звена лейкоцитов проводилась методом хемилюминесценции с двойной последовательной стимуляцией (Образцов И.В., 2015).

- С целью определения средней активности нейтрофила проводился анализ кинетической кривой хемилюминесценции с помощью программного модуля на базе платформы LabView (разработчик А.Ю. Рябов)

Деконволюция кривых позволяет разложить итоговый контур на экспоненциально-квадратичные составляющие: (рис. 1).

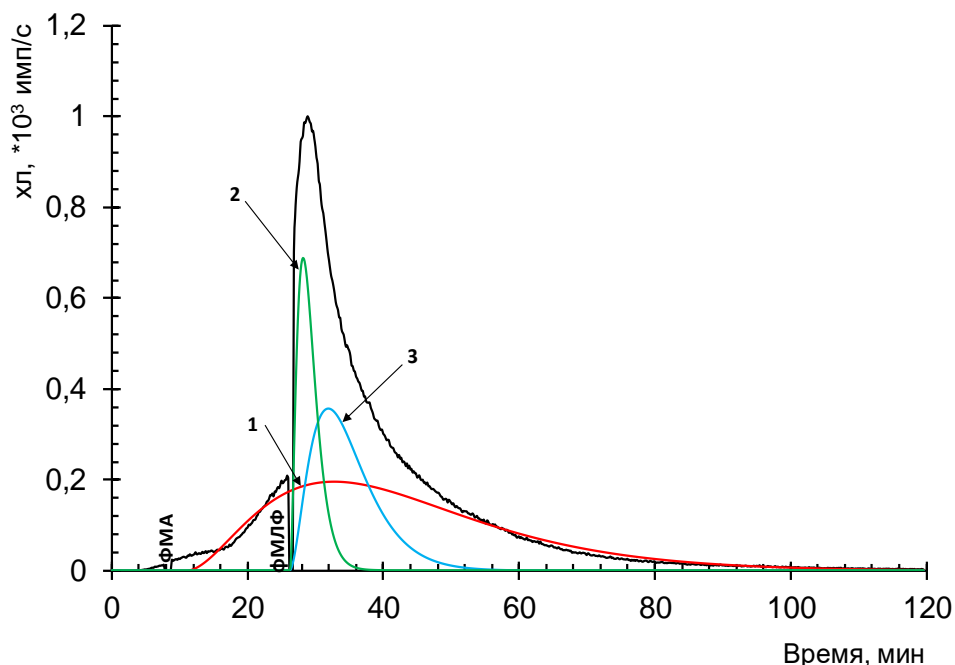


Рис. 1. Экспериментальная кривая и экспоненциально-квадратичные контуры, полученные в результате деконволюции, для крови здорового донора.

а) ФМА-индуцированная продукция АФК (кривая 1)

б) быстрая вспышка фМЛФ-индуцированной кривой, возможно, вызванная продукцией АФК цитоплазматической НАДФН-оксидазой (кривая 2)

в) медленная вспышка, возможно, вызванная АФК НАФДН-оксидазы фаголизосом (кривая 3).

- Уровень окислительного стресса в крови по степени окисленности альбумина проводилась методом флуоресценции.

Статистическую обработку данных проводили, используя программный пакет GraphPad Prisma5.0. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Для проверки гипотезы о нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро–Уилка ($p > 0,05$). Для изучения связи между данными использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Коэффициент корреляции признавался достоверным при $p < 0,05$. Достоверность различия между группами определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Различия признавали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Окислительный статус у больных ААВ.

Согласно проведенному исследованию радикал продуцирующая способность нейтрофилов не зависела от формы васкулита (ГПА, МПА, ЭГПА), что позволило в дальнейшем анализировать в целом всю группу (табл.1).

Таблица 1

Окислительный статус пациентов ГПА, МПА и ЭГПА

Показатель	ГПА(n=31)	МПА(n=5)	ЭГПА(n=4)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы (S(AOA)), $\times 10^3$ имп	Среднее 326 $S_r = 36$	Среднее 626 $S_r = 141$	Среднее 441 $S_r = 141$	Различий нет $p = 0,07$ (ГПА и МПА) $p = 0,73$ (ГПА и ЭГПА) $p = 0,21$ (МПА и ЭГПА)
Удельная пиковая активность нейтрофила (A), $\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)	Среднее 6,4 $S_r = 5,3$	Среднее 5,1 $S_r = 7,3$	Среднее 4,8 $S_r = 0,9$	Различий нет $p = 0,32$ (ГПА и МПА) $p = 0,95$ (ГПА и ЭГПА) $p = 0,51$ (МПА и ЭГПА)
Удельная интегральная активность нейтрофила (S),	Среднее 5608 $S_r = 4406$	Среднее 5017 $S_r = 3851$	Среднее 4971 $S_r = 1911$	Различий нет $p = 0,21$ (ГПА и МПА) $p = 0,86$ (ГПА и

имп/кл				ЭГПА) $p=0,55$ (МПА и ЭГПА)
Коэффициент затухания респираторного взрыва (K_d)	Среднее 0,31 $S_r=0,14$	Среднее 0,35 $S_r=0,25$	Среднее 0,43 $S_r=0,27$	Различий нет $p = 0,82$ (ГПА и МПА) $p=0,57$ (ГПА и ЭГПА) $p=0,71$ (МПА и ЭГПА)
Доля окисленного альбумина	Среднее 0,50 $S_r= 0,14$	Среднее 0,45 $S_r=0,14$	Среднее 0,41 $S_r=0,26$	Различий нет $p= 0,54$ (ГПА и МПА) $p=0,73$ (ГПА и ЭГПА) $p=0,94$ (МПА и ЭГПА)

S_r – среднеквадратичное отклонение

Окислительный статус у больных ААВ ($n = 40$) при сравнении с практически здоровыми донорами ($n = 50$) характеризовался значимыми нарушениями. Так, по сравнению с группой практически здоровых доноров, у больных отмечалось повышение антиоксидантной активности плазмы (S (АОА) = 358) ($p = 0,0001$), удельной пиковой активности нейтрофила ($A = 4,9$) ($p = 0,01$), удельной интегральной активности нейтрофила ($S = 4148$) ($p = 0,02$), базальной радикал-продуцирующей активности ($A_{бз} = 0,42$) ($p = 0,006$) и доли окисленного альбумина ($ДОА = 0,49$) ($p = 0,001$). При этом, коэффициент затухания респираторного взрыва был значимо ниже ($K_d = 0,30$) ($p = 0,01$) (табл.2)

Повышение показателей радикал-продуцирующей функции нейтрофилов свидетельствует об их праймированности при ААВ, что согласуется с данным литературы.

Таблица 2

Окислительный статус пациентов с ААВ и практически здоровых доноров

Показатель	Группа контроля (n=50)	Группа ААВ(n=40)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы (S (АОА)), $\times 10^3$ имп	Медиана 219 ИКР (192–259)	Медиана 358 ИКР (282–438)	S (АОА) значимо выше в группе ААВ, $p = 0,0001$
Удельная пиковая активность	Медиана 2,4 ИКР (1,7–4,1)	Медиана 4,9 ИКР (2,5–7)	A значимо выше в группе ААВ,

нейтрофила (A), $\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)			$p = 0,01$
Удельная интегральная активность нейтрофила (S), имп/кл	Медиана 2374 ИКР (1728-3790)	Медиана 4148 ИКР (3001-6442)	S значимо выше в группе ААВ, $p = 0,001$
Коэффициент затухания респираторного взрыва (K_d)	Медиана 0,38 ИКР (0,32–0,42)	Медиана 0,30 ИКР (0,18-0,46)	K_d значимо ниже в группе ААВ, $p = 0,01$
Базальная радикал-продуцирующая активность ($A_{бз}$), $\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)	Медиана 0,27 ИКР (0,17)	Медиана 0,42 ИКР (0,22)	$A_{бз}$ значимо выше в группе ААВ, $p = 0,006$
Доля окисленного альбумина ($ДОА$)	Медиана 0,26 ИКР (0,18-0,37)	Медиана 0,49 ИКР (0,38-0,59)	$ДОА$ значимо выше в группе ААВ, $p = 0,001$

ИКР – интерквартильный размах

У больных с генерализованной и локальной формами заболевания, различий между антиоксидантной и функциональной (радикал-продуцирующей) выявлено активностью не было. Вместе с тем, было обнаружено значимое различие доли окисленного альбумина ($ДОА$) в группе пациентов с генерализованным течением болезни ($ДОА = 0,56$), по сравнению с группой с локальным течением болезни ($ДОА = 0,47$), ($p = 0,04$), что указывает на степень выраженности окислительного стресса в связи с генерализацией процесса, что возможно указывает на системность окислительного стресса. (табл.3)

Таблица 3

Окислительный статус пациентов с ААВ с локальной и генерализованной формами

Показатель	Локальная (n=9)	Генерализованная (n=31)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы ($S(AOA)$), $\times 10^3$ имп	Среднее 439 $S_r = 265$	Среднее 363 $S_r = 225$	Различий нет, но есть тенденция $p = 0,07$
Удельная пиковая активность нейтрофила (A),	Среднее 9,3 $S_r = 8,4$	Среднее 5,1 $S_r = 3,3$	Различий нет $p = 0,31$

$\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)			
Удельная интегральная активность нейтрофила (S), имп/кл	Среднее 7835 $S_r=6356$	Среднее 4659 $S_r=3098$	Различий нет $p = 0,20$
Коэффициент затухания респираторного взрыва (K_d)	Среднее 0,31 $S_r=0,15$	Среднее 0,34 $S_r=0,17$	Различий нет $p = 0,78$
Доля окисленного альбумина (ДОА)	Среднее 0,47 $S_r= 0,11$	Среднее 0,56 $S_r=0,15$	ДОА значимо выше в группе с генерализованной формой, $p = 0,03$

S_r – среднеквадратичное отклонение

Однако, при сравнении групп больных ААВ с учетом индекса активности BVAS показатели антиоксидантной активности, функциональной активности нейтрофилов и доли окисленного альбумина статистически значимо не различались у больных с высоким и низким индексом (BVAS > 3) и (BVAS от 0 до 2) (табл.4)

Таблица 4

Окислительный статус пациентов с ААВ с активным (BVAS>3) и неактивным (BVAS<3) течением.

Показатель	BVAS<3 (n=13)	BVAS>3 (n=27)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы (S(AOA)), $\times 10^3$ имп	Среднее 453 $S_r = 233$	Среднее 403 $S_r=236$	Различий нет $p = 0,21$
Удельная пиковая активность нейтрофила (A), $\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)	Среднее 5,8 $S_r=4,4$	Среднее 6,2 $S_r=5,6$	Различий нет $p = 0,95$
Удельная интегральная активность нейтрофила (S), имп/кл	Среднее 5040 $S_r=3904$	Среднее 5615 $S_r=4437$	Различий нет $p = 0,51$
Коэффициент затухания респираторного взрыва (K_d)	Среднее 0,32 $S_r=0,18$	Среднее 0,33 $S_r=0,16$	Различий нет $p = 0,54$

Доля окисленного альбумина (ДОА)	Среднее 0,49 $S_r=0,11$	Среднее 0,48 $S_r=0,15$	Различий нет, $p=0,92$
----------------------------------	----------------------------	----------------------------	------------------------

S_r – среднеквадратичное отклонение

АНЦА положительные и АНЦА отрицательные больные имели схожие показатели антиоксидантной активности, функциональной активности нейтрофилов и доли окисленного альбумина (табл.5).

Таблица 5

Окислительный статус пациентов с ААВ с наличием и отсутствием антител к цитоплазме нейтрофилов

Показатель	АНЦА отриц. (n=11)	АНЦА полож (n=18)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы ($S(AOA)$), $\times 10^3$ имп	Среднее 360 $S_r=176$	Среднее 446 $S_r=191$	Различий нет $p=0,21$
Удельная пиковая активность нейтрофила (A), $\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)	Среднее 6,8 $S_r=5,2$	Среднее 4,5 $S_r=3,6$	Различий нет $p=0,23$
Удельная интегральная активность нейтрофила (S), имп/кл	Среднее 6025 $S_r=3924$	Среднее 4195 $S_r=3870$	Различий нет $p=0,19$
Коэффициент затухания респираторного взрыва (K_d)	Среднее 0,33 $S_r=0,17$	Среднее 0,27 $S_r=0,13$	Различий нет $p=0,66$
Доля окисленного альбумина (ДОА)	Среднее 0,46 $S_r=0,17$	Среднее 0,51 $S_r=0,11$	Различий нет, $p=0,53$

S_r – среднеквадратичное отклонение

Вместе с тем при проведении корреляционного анализа выявлена обратная зависимость наличия антител к протеиназе-3 с удельной интегральной активностью нейтрофила (S) и прямая связь с антиоксидантной активностью, $r=0,41$, $p<0,05$.

Корреляционный анализ также продемонстрировал, что наиболее тесная связь выявлена между показателями антиоксидантной активности $S(AOA)$ с:

длительностью болезни, $r = 0,40$. В свою очередь, с длительностью заболевания напрямую был связан индексом VDI, $r = 0,51$, $p < 0,01$.

При изучении окислительного статуса у больных при проведении индукционной терапии и поддерживающей терапии разница не выявлена, что возможно связано с подавлением эффекторных механизмов развития ААВ применяемой терапией и не влияет на функцию нейтрофилов. (табл.6).

Таблица 6

Окислительный статус пациентов с ААВ на индукционной и поддерживающей терапии

Показатель	Поддерживающая терапия (n=16)	Индукционная терапия (n=19)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы($S(AOA)$), $\times 10^3$ имп	Среднее 360 $S_r = 176$	Среднее 446 $S_r = 191$	Различий нет $p = 0,28$
Удельная пиковая активность нейтрофила(A), $\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)	Среднее 6,8 $S_r = 5,2$	Среднее 4,5 $S_r = 3,6$	Различий нет $p = 0,24$
Удельная интегральная активность нейтрофила (S), имп/кл	Среднее 6025 $S_r = 3924$	Среднее 4195 $S_r = 3870$	Различий нет $p = 0,13$
Коэффициент затухания респираторного взрыва (K_d)	Среднее 0,33 $S_r = 0,17$	Среднее 0,27 $S_r = 0,13$	Различий нет $p = 0,61$
Доля окисленного альбумина ($ДОА$)	Среднее 0,46 $S_r = 0,17$	Среднее 0,51 $S_r = 0,11$	Различий нет, $p = 0,55$

S_r – среднеквадратичное отклонение

Для подтверждения этого предположения мы сравнили окислительный статус у больных ААВ и больных СД 2 типа, при котором нет прямого повреждения нейтрофилов.

Сравнение окислительного статуса больных ААВ и СД 2 типа

При сравнении окислительного статуса у больных СД 2 типа ($n = 50$) с практически здоровыми донорами ($n = 40$) выявлены: значимое повышение

антиоксидантной активности плазмы ($S(AOA) = 697$) ($p = 0,0001$), удельной пиковой активности нейтрофила ($A = 3,8$), ($p = 0,002$) у пациентов с СД 2 типа. При этом, коэффициент затухания респираторного взрыва у данной группы был значимо ниже ($K_d = 0,19$), ($p = 0,0001$). Статистически значимого различия показателя интегральной активности нейтрофила и доли окисленного альбумина между двумя группами не было выявлено

При сравнении окислительного статуса у больных ААВ ($n = 40$) с больными СД 2 типа ($n = 50$) отмечается что: у больных ААВ антиоксидантная активность плазмы ($S(AOA) = 358$), ($p = 0,0001$) ниже, а коэффициент затухания респираторного взрыва ($K_d = 0,30$), ($p = 0,02$) статистически значимо выше; показатели удельной пиковой активности нейтрофила и удельной интегральной активности нейтрофила не отличаются в двух группах. Доля окисленного альбумина значимо выше в группе пациентов с ААВ ($DOA = 0,49$) ($p = 0,0001$) (табл. 7, 8).

Таблица 7

Окислительный статус пациентов с СД 2 типа и практически здоровых доноров

Показатель	Группа контроля (n=40)	Группа СД 2 типа (n=50)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы($S(AOA)$), $\times 10^3$ имп	Медиана 219 ИКР (192 - 259)	Медиана 697 ИКР (459 - 937)	$S(AOA)$ значимо выше в группе СД 2 типа, $p = 0,0001$
Удельная пиковая активность нейтрофила(A), $\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)	Медиана 2,4 ИКР (1,7 -4,1)	Медиана 3,8 ИКР (2,5-6,6)	A значимо выше в группе СД 2 типа, $p = 0,002$
Удельная интегральная активность нейтрофила (S), ипм/кл	Медиана 2374 ИКР (1728-3790)	Медиана 2848 ИКР (2129-5420)	Различий нет $p = 0,14$
Коэффициент затухания респираторного взрыва (K_d)	Медиана 0,38 ИКР (0,32–0,42)	Медиана 0,19 ИКР (0,16–0,27)	K_d значимо ниже в группе СД 2 типа, $p = 0,0001$
Доля окисленного альбумина (DOA)	Медиана 0,26 ИКР (0,18-0,37)	Медиана 0,21 ИКР (0,11-0,33)	Различий нет $p = 0,07$

ИКР – интерквартильный размах

Таблица 8

Окислительный статус пациентов с ААВ и пациентов с СД 2 типа

Показатель	Группа СД 2 типа (n=50)	Группа ААВ (n=40)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы ($S(AOA)$), $\times 10^3$ имп	Медиана 697 ИКР (459 - 937)	Медиана 358 ИКР (282 - 438)	$S(AOA)$ значительно ниже в группе ААВ, $p = 0,0001$
Удельная пиковая активность нейтрофила (A), $\times 10^{-2}$ имп/(с·кл)	Медиана 3,8 ИКР (2,5-6,6)	Медиана 4,9 ИКР (2,5 - 7)	Различий нет $p = 0,22$
Удельная интегральная активность нейтрофила (S), ипм/кл	Медиана 2848 ИКР (2129-5420)	Медиана 4148 ИКР (3001-6442)	Различий нет $p = 0,15$
Коэффициент затухания респираторного взрыва (K_d)	Медиана 0,19 ИКР (0,16–0,27)	Медиана 0,30 ИКР (0,18-0,46)	K_d значительно выше в группе ААВ, $p = 0,02$
Доля окисленного альбумина (DOA)	Медиана 0,21 ИКР (0,11-0,33)	Медиана 0,49 ИКР (0,38-0,59)	DOA значительно выше в группе ААВ, $p = 0,0001$

ИКР – интерквартильный размах

Антиоксидантная активность у больных СД 2 типа ($S(AOA) = 510$) с повышенными показателями маркеров воспаления значительно выше чем при активном ААВ ($S(AOA) = 307$). DOA напротив значительно выше у больных ААВ ($DOA = 50$), ($p = 0,002$) (табл. 9)

Таблица 9

Окислительный статус пациентов с ААВ ($BVAS > 2$) и пациентов СД 2 типа с маркерами воспаления (СРБ, фибриноген, СОЭ)

Показатель	СД 2 типа (n=21)	Группа ААВ (n=26)	Выводы
Антиоксидантная активность плазмы ($S(AOA)$), $\times 10^3$ имп.	Медиана 510 ИКР (403-807)	Медиана 307 ИКР (222-446)	$S(AOA)$ значительно выше в группе СД 2 типа, $p = 0,001$
Доля окисленного альбумина (DOA)	Медиана 22 ИКР (15-37)	Медиана 50 ИКР (36-61)	DOA значительно выше в группе ААВ, $p = 0,002$

ИКР – интерквартильный размах

Учитывая важную роль в окислительном балансе мочевой кислоты, мы сравнили больных СД 2 типа и ААВ с высокими значениями мочевой кислоты не выявили статистически значимого различия между показателями $S(AOA)$ в обеих группах. Вместе с тем, DOA была значимо выше в группе больных с ААВ ($DOA = 45,8$) (табл. 10). Кроме того, при нормальном уровне мочевой кислоты AOA выше в группе СД 2 типа ($S(AOA) = 785$), ($p = 0,0001$), а DOA выше в группе ААВ ($DOA = 51,7$), ($p = 0,001$) (табл. 11).

Таблица 10

Окислительный статус пациентов с повышенной мочевой кислотой при ААВ и при СД 2 типа

Показатель	СД 2 типа (n=13)	Группа ААВ (n=5)	Вывод
Антиоксидантная активность плазмы($S(AOA)$), $\times 10^3$ имп.	Медиана 459 ИКР (404-619)	Медиана 581 ИКР (333-1039)	Различий нет $p = 0,09$
Доля окисленного альбумина (DOA)	Медиана 19,5 ИКР (11-35)	Медиана 45,8 ИКР (40-56)	DOA значимо выше в группе ААВ, $p = 0,006$

ИКР – интерквартильный размах

Таблица 11

Окислительный статус пациентов с нормальным значением мочевой кислоты при ААВ и при СД 2 типа

Показатель	СД 2 типа (n=37)	Группа ААВ (n=30)	Вывод
Антиоксидантная активность плазмы($S(AOA)$), $\times 10^3$ имп.	Медиана 785 ИКР (468,5-963,5)	Медиана 344,5 ИКР (249,3-406)	$S(AOA)$ значимо выше в группе СД 2 типа, $p = 0,0001$
Доля окисленного альбумина (DOA)	Медиана 17,5 ИКР (8-33)	Медиана 51,7 ИКР (38,5-58,7)	DOA значимо выше в группе ААВ, $p = 0,001$

ИКР – интерквартильный размах

Таким образом, более выраженные изменения при ААВ с тяжелым первоначальным повреждением нейтрофилов приводят к более значимым нарушениям радикал-продуцирующей функции нейтрофилов.

В ходе корреляционного анализа обнаружена связь среди показателей окислительного статуса: прямая зависимость удельной интегральной

активности (S) от удельной пиковой активности (A) нейтрофила $r = 0,9$, $p < 0,01$, обратная зависимость (A) от коэффициента затухания свечения (Kd), $r = -0,52$, $p < 0,01$ и обратная зависимость между $S(AOA)$ и S , $r = -0,38$, $p < 0,05$, что явилось основанием детального изучения функции нейтрофилов для построения прогностической математической модели их функционирования (обратимости повреждения).

Для уточнения предикторного значения степени нарушения окислительного статуса на основе функциональной способности нейтрофилов, было произведено математическое моделирование кинетической кривой хемилюминесценции (деконволюция).

Для всех доноров деконволюция привела к вычленению трех функций (рис. 2): а) ФМА-индуцированная продукция АФК, б) «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная продукцией внеклеточных АФК, и в) «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная продукцией внутриклеточных АФК.

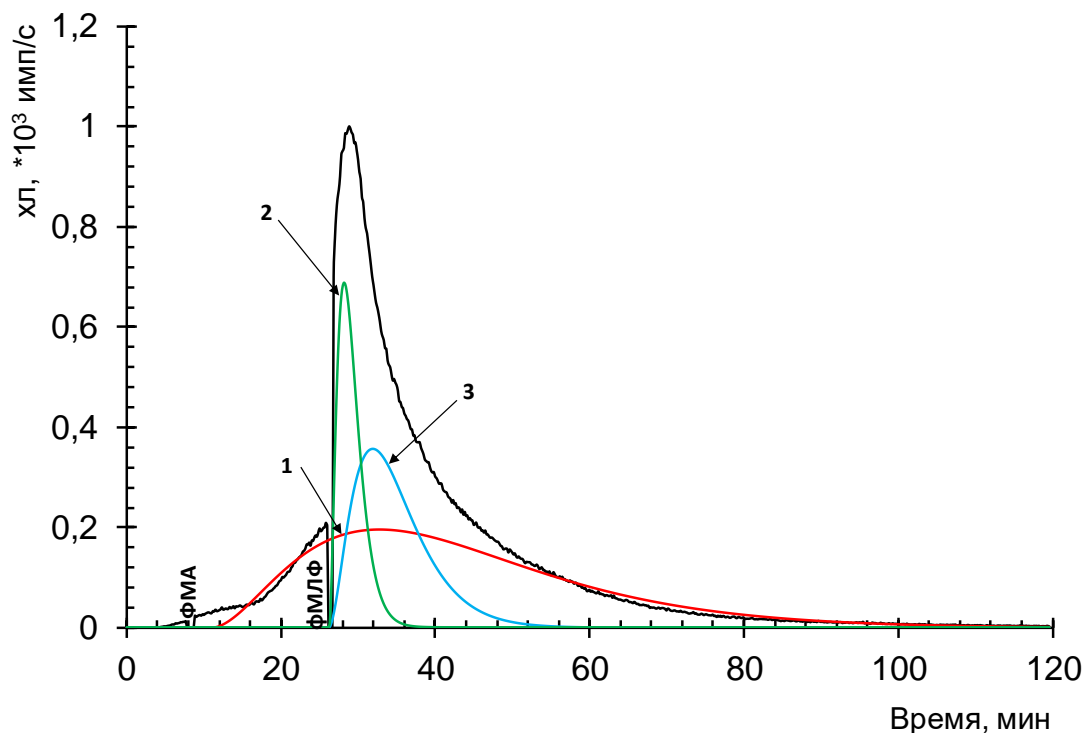


Рис. 2. Кинетическая кривая ХЛ нейтрофилов донора, с двухстадийной стимуляцией и результат математической деконволюции на три контура. **1** - ФМА-индуцированная продукция АФК, **2** - «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка, **3** - «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка

В результате деконволюции кривых ХЛ все пациенты ААВ разделились на две группы с наличием всех трех кривых ($n = 10$), и двух кривых ($n = 17$). У больных с двумя кривыми отсутствовала «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка. Пациенты с отсутствием «медленной» вспышки отличались между собой светосуммой (площадь под кривой) ФМА-индуцированной продукции

АФК. Таким образом по результатам деконволюции пациенты были условно разделены на 3 группы.

1) *Первую группу* вошли пациенты ($n = 10$) с активным течением, с длительностью болезни до двух лет, с поражением легких ($n = 6$), $VDI < 3$, у трех больных во время пребывания в отделении был вторичный инфекционный процесс.

В кинетической кривой продукции свободных радикалов присутствуют все три составляющие (рис. 3).

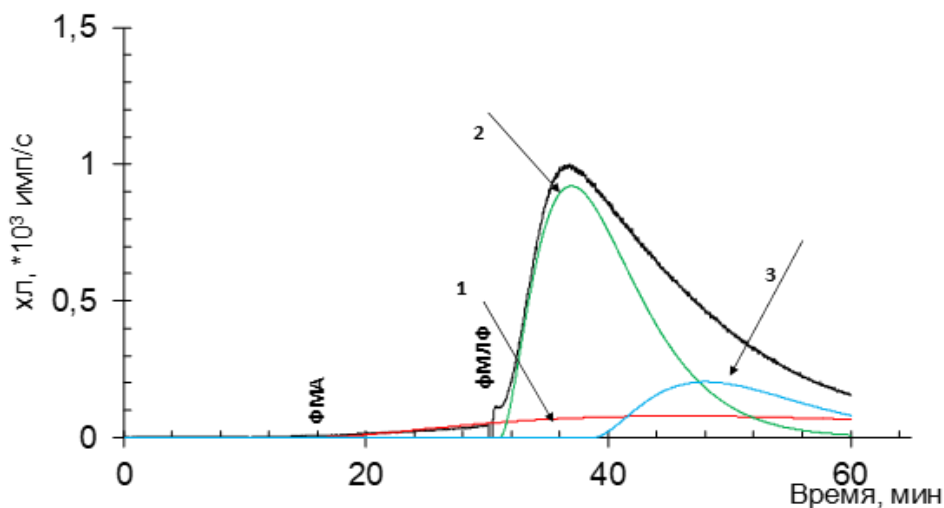


Рис. 3. Кинетическая кривая ХЛ нейтрофилов пациента, с двухстадийной стимуляцией и результат математической деконволюции на три контура. **1** - ФМА-индуцированная продукция АФК, **2** - «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка, **3** - «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка

2) *Вторую группу* составили пациенты ($n = 7$) с разной степенью активности, с поражением легких и почек ($n = 3$), с длительностью болезни от 1 года до 6 лет, и с более высокими показателями VDI от 2–4, вторичный инфекционный процесс развился у 1 больного.

В кинетической кривой продукции свободных радикалов отсутствует «медленная вспышка» (рис.4).

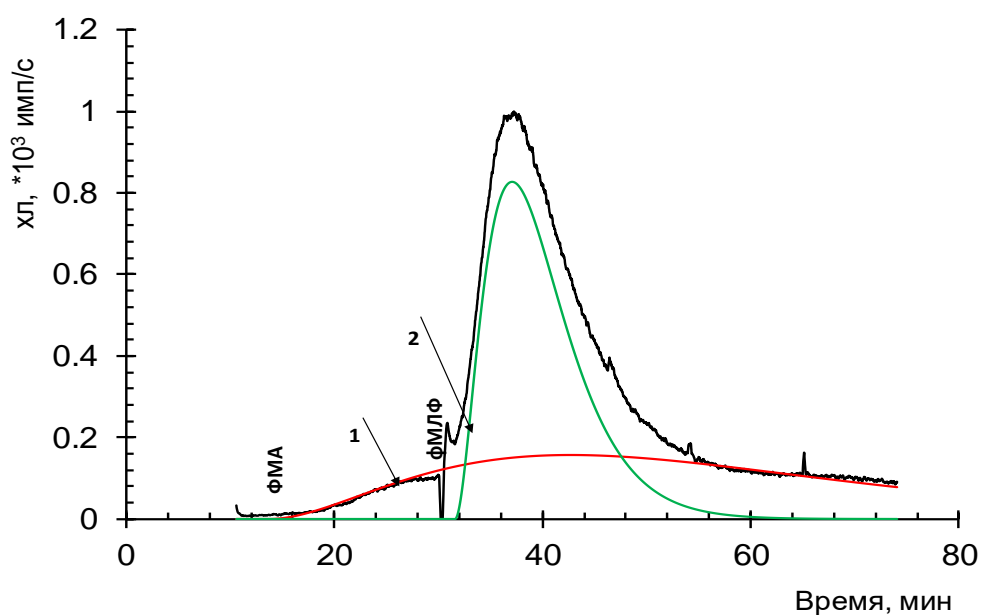


Рис. 4. Кинетическая кривая ХЛ нейтрофилов пациента с двухстадийной стимуляцией и результат математической деконволюции на три контура. **1** - ФМА-индуцированная продукция АФК, **2** - «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка. *Отсутствует фМЛФ-индуцированная «медленная» вспышка*

3) Третью группу составили пациенты ($n = 10$) с умеренной активностью и в ремиссии, поражение почек и легких было у $n = 7$ больных, длительность болезни составила от 2 до 23 лет, VDI 4–8, вторичный инфекционный процесс у $n = 6$ больных во время пребывания в клинике. В кинетической кривой продукции свободных радикалов отсутствует медленная вспышка в сочетании с выраженной продукцией ФМА-индуцированной ХЛ (рис.5).

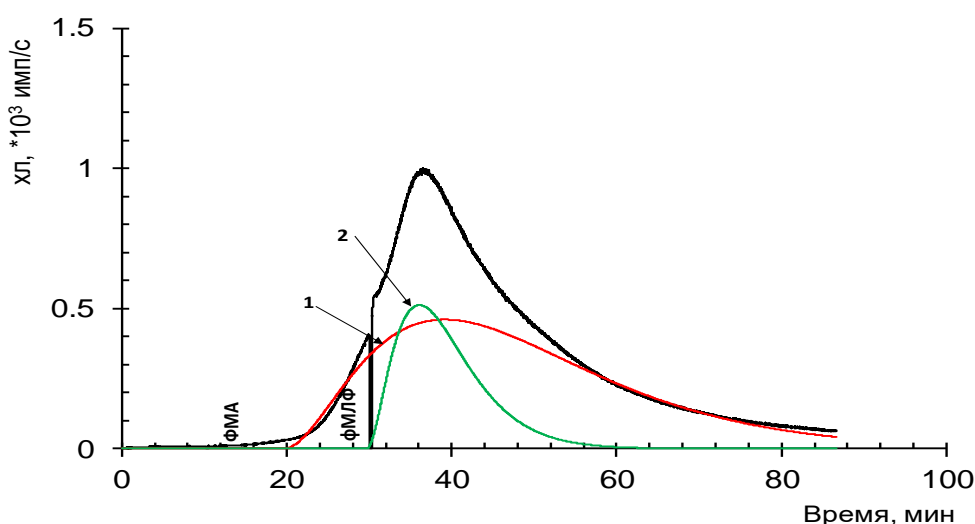


Рис. 5. Кинетическая кривая ХЛ нейтрофилов пациента с двухстадийной стимуляцией и результат математической деконволюции на три контура. **1** - ФМА-индуцированная продукция АФК, **2** - «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка. *Отсутствует фМЛФ-индуцированная «медленная» вспышка и сильно выражена ФМА-индуцированная продукция АФК.*

Для подтверждения полученных данных были сопоставлены светосуммы (площадь под кривой) между группой доноров и выделенными группами по количеству кривых (табл.12 и 13).

Сравнение продемонстрировало, что светосумма (S_1) ФМА-индуцированного ответа у здоровых доноров (135,2) значимо ниже, чем у пациентов с ААВ (391,3) ($p = 0,0001$); светосумма быстрой вспышки (S_2) по фМЛФ-индуцированному ответу у здоровых доноров (416,1) больных значимо выше, чем у пациентов ААВ (360,7) ($p = 0,03$); светосумма (S_3) медленной вспышки по фМЛФ-индуцированному ответу у здоровых доноров (776,5) также выше, чем у пациентов с ААВ (317), ($p = 0,0001$) (табл.12).

Таблица 12

Сравнение показателей светосуммы у пациентов ААВ и практически здоровых доноров

Показатель	Доноры (n=10)	ААВ(n=27)	p
$S_1, \times 10^3$ имп	135,2 ИКР (132,7 - 137,5)	391,3 ИКР (252 - 525)	0,0001
$S_2, \times 10^3$ имп	416,1 ИКР (415 - 422,8)	360,7 ИКР (312 - 417)	0,03
$S_3, \times 10^3$ имп	776,5 ИКР (764 - 816,9)	317 ИКР (189,5 – 377,5)	0,0001

ИКР – интерквартильный размах

Таким образом, светосумма (S_1) ФМА-индуцированного ответа у 3-ей группы (595) значимо выше светосуммы 1-ой группы (271) ($p=0.002$) и 2-ой группы (346,2); различия (S_1) между 1-ой и 2-ой группами не значимы ($p=0.2$)

Различия светосуммы «быстрой» вспышки (S_2) по фМЛФ-индуцированному ответу у групп 1, 2, 3 нет (табл.13).

Таблица 13

Сравнение показателей светосуммы у пациентов ААВ в зависимости от типа формирования деконволюции кривой ХЛ.

Показатель	1-я группа(n=10)	2-я группа(n=7)	3-я группа(n=10)	p
$S_1, \times 10^3$ имп	271,3 $S_r = 0,42$	346,2 $S_r = 0,40$	595,5 $S_r = 0,71$	0,2 (1 и 2) 0,002 (1 и 3) 0,01 (2 и 3)
$S_2, \times 10^3$ имп	386 $S_r = 0,39$	423,3 $S_r = 0,45$	359,5 $S_r = 0,33$	0,3 (1 и 2) 0,2 (1 и 3) 0,4 (2 и 3)

S_r – среднеквадратичное отклонение

При корреляционном анализе выявлена прямая зависимость между показателями светосуммы (S_1) ФМА-индуцированного ответа и VDI, $r=0.42$ ($p<0.05$), что может служить маркером неблагоприятного течения заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Радикал-продуцирующая способность нейтрофила у больных ААВ повышена по сравнению с группой здоровых доноров и больных СД 2 типа, что выражается в усилении базальной и стимулированной ФМА и фМЛФ продукции свободных радикалов нейтрофилами.

2. Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов при ААВ является дефектной, о чем свидетельствует значимо меньшая величина коэффициента затухания по сравнению с группой здоровых доноров ($p=0,01$) стимулированной продукции свободных радикалов и снижение/отсутствие внутриклеточной составляющей продукции свободных радикалов нейтрофилами.

3. Доля окисленного альбумина у пациентов с ААВ по сравнению с группой здоровых доноров ($p=0,001$) и сахарного СД 2 типа ($p=0,0001$) была значимо выше, что отражает степень системного окислительного стресса.

4. Антиоксидантная активность у больных ААВ выше антиоксидантной активности здоровых доноров ($p=0,0001$) и ниже, чем у больных СД 2 типа ($p=0,0001$).

5. Выявлена положительная корреляция между длительностью заболевания и антиоксидантной активностью, что возможно, является следствием компенсации системного окислительного стресса или результатом длительного лечения иммуносупрессорами с антиоксидантными свойствами ($r = 0,40, p < 0,05$).

6. Параметры, полученные при деконволюции радикал-продуцирующей кинетической кривой нейтрофилов имеют диагностическое и прогностическое значение. Появление всех трех кривых последовательно отражающих окислительный баланс нейтрофилов, свидетельствует о благоприятном течении заболевания; отсутствие кривой, соответствующей медленной вспышке отмечается при генерализованной форме болезни (при поражении легких и почек), а также позволяет прогнозировать возможные инфекционные осложнения; отсутствие медленной вспышки при повышенном ответе на ФМА свидетельствует о нарастании тяжести заболевания, при этом ответ на ФМА коррелирует с тяжестью болезни (индекс VDI) ($r=0.42, p<0.05$)

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Больным ААВ рекомендуется исследование окислительного статуса с использованием хемилюминисцентных методов для оценки прогноза течения болезни.
2. В случае снижения или отсутствия внутриклеточной составляющей на кривой ХЛ рекомендуется дополнительная антибактериальная терапия в дозе соответствующей тяжести болезни и риска развития вторичной инфекции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Проскурнина Е.В. Новые люминесцентные методы оценки окислительного стресса у больных с системными васкулитами / Е.В. Проскурнина, А.Е. Шеримова, А.М. Полимова, М.М. Созарукова, Г.А. Владимирова, Т.Н. Краснова // Технологии живых систем. - 2016. - № 8(13). - - С. 26-34.

2. Шеримова А.Е. Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов у пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами / А.Е. Шеримова, М.М. Созарукова, Т.Н. Краснова, Е.В. Проскурнина, П.И. Новиков, Н.А. Мухин. // Клиническая фармакология и терапия. - 2017. - № 26(5). - С. 37-40.

3. Шеримова А.Е. Сопоставление окислительного профиля и клинико-лабораторных показателей при АНЦА-ассоциированных васкулитах / А.Е. Шеримова, Е.В. Проскурнина, Т.Н. Краснова. // Здоровье и образование в XXI веке. - 2017. - № 12(19). - С. 268-271.

СПИСОК СОКРАЩЕНИИ

ААВ	АНЦА-ассоциированные васкулиты
АНЦА	антинейтрофильные цитоплазматические антитела
АОА	антиоксидантная активность
АФК	активные формы кислорода
ГПА	гранулематоз с полиангиитом (гранулематоз Вегенера)
ДОА	доля окисленного альбумина
МПА	микроскопический полиангиит
МПО	миелопероксидаза
ПР-3	протеиназа-3
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
СР	свободные радикалы
СРБ	С-реактивный белок
ЭГПА	эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (синдром Черга-Страусс)
BVAS	Бирмингемский индекс активности васкулита (Birmingham Vasculitis Activity Score)
VDI	Индекс повреждений при васкулите (Vasculitis Damage Score)

Шеримова Аида Ержановна (Российская Федерация)
«Прогностическое значение изменения окислительного статуса для течения АНЦА-ассоциированных васкулитов»

В исследование были включены 40 пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами (ААВ), которым проводилась комплексная оценка изменения окислительного статуса хемилюминесцентными методами.

Результаты работы показали нарушение окислительного статуса в виде: повышения радикал-продуцирующей способности нейтрофилов и ее дефекта за счет снижения/отсутствия внутриклеточной фаголизосомальной продукции АФК; повышения антиоксидантной активности, а также связи ее с длительностью болезни и индексом тяжести необратимых поражений (VDI); повышения доли окисленного альбумина, причем этот показатель был значимо выше при генерализованной форме чем при локальной.

Результаты дополнительного математического моделирования продемонстрировали, что величина показателей свободнорадикального дисбаланса и форма кривых отличались в зависимости от тяжести и течения заболевания.

Результаты сравнения параметров окислительного статуса между группами больных ААВ и СД 2 типа, позволили выявить различия в выраженности окислительного стресса при иммунном и условно «неиммунном» генезе поражения сосудов.

Sherimova Aida Erzhanovna (Russian Federation)
«Prognostic value of oxidative status change for the course of ANCA-associated vasculitis»

The study included 40 patients with ANCA-associated vasculitis (AAB) who underwent a comprehensive assessment of the change in oxidative status by chemiluminescent methods.

The results of study are showed a disturbance of the oxidative status in the form of: an increase in the radical production capacity of neutrophils and its defect due to the decrease / absence of intracellular phagolysosomal products of AFK; increase antioxidant activity, as well as its connection with the duration of the disease and the vasculitis damage index (VDI); increasing the proportion of oxidized albumin, which was significantly higher for generalized form than for local.

The results of additional mathematical modeling demonstrated that the free radical imbalance parameters and the shape of the curves differed depending on the severity and course of the disease.

The results of comparison of oxidative status parameters between groups of patients with AAB and diabetes mellitus type 2 made it possible to identify differences in the expression of oxidative stress in the immune and conditionally "non-immune" genesis of vascular lesions.