

**ПОКАЛЕНЬЕВА
МАРИЯ ШАМИЛЕВНА**

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ
ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ**

14.03.03 – патологическая физиология 14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Болевич Сергей Бранкович

доктор медицинских наук, профессор

Соснова Елена Алексеевна

Официальные оппоненты:

Фархутдинов Рафагат Равильевич - доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Центральная научно-исследовательская лаборатория, ведущий научный сотрудник.

Шалина Раиса Ивановна - доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач России, ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, кафедра акушерства и гинекологии, профессор кафедры.

Ведущая организация: ФГАОУ «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки России

Защита состоится « ____ » _____ 2018 г. в ____ на заседании

Диссертационного Совета Д.208.040.08 ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая д. 8, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д 37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор медицинских наук,
профессор

Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Медицинская и социальная значимость проблемы невынашивания беременности, обусловлена ее влиянием на демографические показатели в РФ. В структуре акушерско-гинекологической заболеваемости невынашивание занимает одно из первых мест, оказывая влияние на уровень перинатальной заболеваемости, смертности и репродуктивное здоровье женщин (Айламазян, Э.К., 2007). Частота невынашивания беременности составляет 15-27% от общего числа всех выявленных беременностей, при этом на долю привычного выкидыша (ПНБ) приходится от 5 до 20%. К наиболее частым причинам ПНБ относят: генетические, эндокринные, иммунологические, гемастазиологические нарушения репродуктивной системы, бактериальные и вирусные инфекции (Сидельникова, В.М., 2002).

Однако, генез невынашивания зачастую остается неясным (идиопатическое ПНБ), составляющего около 50%. Несмотря на успехе в диагностике и лечении самопроизвольных прерываний беременности, частота ПНБ остается достаточно высокой и не имеет тенденции к снижению. Вопрос об этиологической роли свободнорадикальных процессов при невынашивании беременности широко дискутируется в литературе. Изменения в тканях плаценты процессов свободнорадикального окисления (СРО), вызывающие повреждения структуры и нарушение проницаемости клеточных мембран играет немаловажную роль в патогенезе невынашивания беременности (Jauniaux, E., 2016). Данные деструктивные процессы возникают вследствие проявляющегося дисбаланса между интенсивностью СРО и эффективностью системы антирадикальной защиты. Однако вопросы, связанные с изучением механизмов генерации активных форм кислорода (АФК) и активностью антиоксидантной защиты у женщин с ПНБ остаются практически не изученными.

В связи с этим представляет научный и практический интерес изучение механизмов генерации активных форм кислорода, состояние антиоксидантной системы у женщин с ПНБ, а также оценка доли окисленного альбумина, как маркера системного оксидативного стресса. Эти исследования позволят внести ясность в патофизиологические механизмы, приводящие к прерыванию беременности, а также возможно помогут разработать диагностические и прогностические параметры.

Цель исследования – Выяснение патофизиологической роли свободно-радикальных процессов при привычном невынашивании беременности и на этой основе предложить диагностические и прогностические параметры

Задачи исследования

1. Исследовать радикал-продуцирующую функцию нейтрофилов крови у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ).
2. Определить антиоксидантный профиль плазмы крови у женщин с ПНБ.
3. Оценить степень системного оксидативного стресса у женщин с ПНБ по степени окисленно-модифицированного альбумина
4. Сопоставить полученные показатели окислительного стресса с клиническими данными и предложить диагностические и прогностические параметры.

Научная новизна работы

1. Проведенное исследование впервые выявило, что во время беременности, как физиологической, так и протекающей на фоне угрозы прерывания, нейтрофилы находятся в состоянии прайминга, о чем свидетельствует повышенный уровень базальной продукции свободных радикалов и повышенный ответ на стимулы.
2. Впервые установлено, что у женщин с неразвивающейся беременностью ответ нейтрофилов на стимулы был снижен, что указывает на иммуносупрессивное состояние, препятствующее самопроизвольному прерыванию беременности.
3. Впервые установлено, что антиоксидантная активность плазмы крови снижена после самопроизвольного аборта, что свидетельствует о расходовании антиоксидантов крови из-за развивающегося окислительного стресса в момент прерывания беременности.
4. Впервые установлено, что при неразвивающейся беременности антиоксидантная активность плазмы повышена, что указывает на присутствие в крови специфических молекул, обладающих антиоксидантными свойствами.
5. Впервые установлено, что у здоровых беременных, беременных с угрозой прерывания нет системного оксидативного стресса, затрагивающего белковое звено.

Теоретическая и практическая значимость

1. Продемонстрирована потенциальная возможность использования лабораторных критериев окислительного стресса в качестве прогностических маркеров преждевременного прерывания беременности и неразвивающейся беременности.
2. Доказана эффективность кинетической хемилюминесценции для оценки функционального состояния нейтрофилов и антиоксидантной активности плазмы крови у женщин с угрозой прерывания.

3. Доказана эффективность определения доли окисленного альбумина в качестве параметра, характеризующего транспортную функцию альбумина и маркера системного окислительного стресса у беременных женщин.

4. Полученные данные подтвердили необходимость персонифицированного подхода к выбору антиоксидантной терапии во время угрозы прерывания и дозирования гормональных препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У здоровых беременных стимулированная радикал-продуцирующая функция нейтрофилов повышена по сравнению с небеременными женщинами.
2. При неразвивающейся беременности нейтрофильное звено иммунитета характеризуется сниженной базальной и стимулированной радикал-продуцирующей активностью.
3. Непосредственно сразу после выкидыша базальная и стимулированная активность нейтрофилов повышена по сравнению со здоровыми беременными. У беременных с угрозой прерывания отмечалась повышенная стимулированная активность по отношению к здоровым беременным.
4. При нормальной беременности и беременности с угрозой прерывания не развивается системного окислительного стресса, затрагивающего белковое звено.
5. В группах здоровых женщин, здоровых беременных женщин и с угрозой прерывания антиоксидантная емкость плазмы различается незначимо; при выкидыше этот показатель снижается, а при неразвивающейся беременности повышается.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения, описанные данные, выводы и рекомендации, сформулированные в работе базируются на исследовании 125 пациентов с их письменного согласия. Дизайн исследования включал клиническую оценку пациентов, а также современные методы исследования. Полученные данные были статистически обработаны при помощи пакета программ для статистической обработки данных GraphPad Prisma 6.0.c использованием параметрических и непараметрических методов оценки результатов. Основные результаты исследования доложены и обсуждены на совместной научно-практической конференции коллектива сотрудников кафедры патологии человека лечебного факультета и кафедры акушерства и гинекологии №1 лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ 25 сентября 2017г. Результаты диссертационного исследования доложены в устных докладах и материалах следующих международных конференций и конгрессов: Российская научно-практическая

конференция с международным участием: «Снегиревские чтения-2016». День молодых исследователей. Москва. XXVII Ежегодная международная конференция РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» Санкт-Петербург 2017г. XXX Юбилейный международный конгресс с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» Москва 2017.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. Автор подготовил обзор данных отечественных и зарубежных источников литературы по теме исследования, сформулированы цель и задачи диссертационной работы. Автором составлена компьютерная база данных 125 беременных, проведена аналитическая и статистическая обработки, даны научное обоснование и обобщение полученных результатов, сформулированы выводы и даны практические рекомендации. Автор самостоятельно проводила лабораторные исследования функциональной активности нейтрофилов; антиоксидантной емкости плазмы, определение доли окисленного альбумина. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их практической и клинико-лабораторной реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах и их внедрения в практику.

Внедрение результатов диссертации в практику

Полученные результаты используются в педагогическом процессе, в лекциях и практических занятиях по подготовке ординаторов и слушателей на кафедрах акушерства и гинекологии №1 и патологии человека лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют: паспорту специальности 14.03.03 – патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 1,2 и 9, паспорту специальности.14.01.01 – акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1 и 4 паспорта специальности.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 3 в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования РФ для публикаций основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 99 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и списка литературы, включающего источников, из них 54 отечественных и 112 зарубежных. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 8 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клиническая часть исследования была выполнена в гинекологическом и акушерском отделении ГБУЗ «Дмитровская городская больница» в период с 2013 по 2016 год. Экспериментальная часть проводилась на базе кафедры медицинской биофизики ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова (зав. кафедрой академик РАН Владимиров Ю.А.). Для решения поставленных задач было выполнено комплексное клинико-лабораторное обследование 125 пациентов. Из них 28 беременных с угрозой прерывания (УПБ), из которых у 19 был установлен диагноз привычное невынашивание, Средний срок беременности составил $19,3 \pm 7,6$ нед. Угроза прерывания проявлялась тянущими болями внизу живота, скудными кровянистыми выделения из половых путей. У 2 женщин произошла гибель эмбриона на сроке беременности 8-9 недель. У остальных пациенток беременность завершилась самопроизвольным выкидышем или преждевременными родами. Группа пациенток с неразвивающейся беременностью ($n = 9$). Средний срок беременности составил $6,1 \pm 1,5$ нед. Группу К1 составили 61 пациентка, беременность которых закончилась срочными родами. Средний срок беременности составил $15,6 \pm 8,3$ нед. Небеременные здоровые женщины (К2). Средний возраст составил 29,6 лет. Группа женщин после самопроизвольного выкидыша ($n = 5$). Давность выкидыша от 4,5 до 48 часов. 9 женщин с неразвивающейся беременностью (НБ). Группу контроля 1 (К1) составили 61 женщина с физиологическим течением беременности. Группу контроля 2 (К2) — 22 небеременные женщины, 5 женщин после самопроизвольного выкидыша до 22 нед. (К3). Критериями включения пациентов в исследование были: возраст от 18 лет, женский пол, давность выкидыша для группы К3 не более 48 часов, желание и способность пациента принять участие в исследовании и выполнять требования исследования, наличие подписанной формы информированного согласия на участие в исследовании. Критериями исключения: маточная патология (пороки развития матки, миома матки и т.д.), острые инфекционные и воспалительные заболевания, отказ подписывать добровольное информированное согласие. Клинические методы исследования пациенток включали: сбор анамнестических данных, общий осмотр,

специальное гинекологическое исследование. Всем пациенткам проводились общепринятые лабораторно-инструментальные методы исследования клинический и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, исследование системы гемостаза, электрокардиография, обследование на ВИЧ, гепатиты В и С, антитела к бактериоскопическое исследование мазков из влагалища, ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза.

Методики определения оксидативного стресса: Регистрацию хемилюминисценции осуществляли на одно (Lum100) на 12-ти кюветном (Lum1200) хемилюминометре (ДИСофт, Россия). Использовали люминол (в качестве ХЛ зонда) (Sigma, США). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301PC (SHIMADZU, Япония) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1,00 см.

Оценка функциональной активности нейтрофильного звена лейкоцитов методом хемилюминесценции с двойной последовательной стимуляцией: в кювету, содержащую раствор Хенкса и люминол в конечной концентрации 45 мкМ, помещали цельную кровь, отобранную в вакутейнеры с гепарином, в конечной концентрации 4,5% (45 мкл на 1,000 мл раствора в кювете) и регистрировали спонтанную хемилюминесценцию (ХЛ) в течение 12 минут, затем вносили ФМА (конечная концентрация в кювете 50 нг/мл). После 20 минут инкубации проводили стимуляцию фМЛФ (конечная концентрация 10 мкМ) и регистрировали индуцированный ХЛ ответ в течение не менее 60 мин.

Математическое моделирование хемилюминограмм кривых нейтрофилов методом деконволюции: ХЛ кривая имеет сложный характер и может быть математически смоделирована и разложена на три составляющие: 1) ФМА-индуцированная продукция АФК, 2) «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная внеклеточной продукцией АФК через рецепторный путь, 3) «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная внутриклеточной продукцией АФК.

Определение антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической хемилюминесценции: Объем 50,0 мкл 50 мМ раствора АБАП (2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид) и 20,0 мкл 0,1 мМ люминола предварительно инкубировали в течении 20 минут при комнатной температуре в темноте. Реакцию терморазложения источника радикалов инициировали добавлением необходимого объема предварительно нагретого фосфатного буферного раствора (37°C). Регистрировали свечение до достижения стационарного уровня (I_0) при 37°C, затем добавляли 10 мкл разбавленную в 10 раз фосфатным буферным раствором плазму крови,

Оценка окислительной модификации альбумина по триптофановой флуоресценции: долю окисленного альбумина (ДОА) определяли

спектрофлуориметрическим способом. Метод основан на измерении флуоресценции альбумина в плазме, расчете его концентрации по градуировочной зависимости и вычислении ДОА, исходя из общей концентрации белка, определенной биохимическим способом.

Статистическая обработка материала

Статистическую обработку данных проводили, используя программный пакет GraphPad Prisma 6.0. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Для проверки гипотезы о нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро–Уилка ($p > 0,05$). Достоверность различия между группами определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Различия признавали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Новый метод ХЛ оценки функциональной активности нейтрофилов, основанный на последовательной стимуляции в образце цельной крови двумя стимулами, позволяет оценить максимальный радикал-продуцирующий потенциал нейтрофилов. Стимулы ФМА и фМЛФ имеют разный механизм действия. ФМА (внутриклеточный механизм) проникает в клетку путем пассивной диффузии и активирует протеинкиназу С. фМЛФ характеризуется внеклеточным рецепторным механизмом, причем стимуляция фМЛФ обусловлена последовательной сменой внеклеточного и внутриклеточного синтеза АФК. Взаимодействие фМЛФ со специфическими рецепторами приводит к немедленной выработке АФК во внеклеточную среду НАДФ-Н оксидазными комплексами, находящимися на плазматической мембране. Активация рецепторов фМЛФ стимулирует растянутый во времени процесс фагоцитоза и образование фагосом, в которых также происходит синтез АФК. Основным источником АФК в крови являются фагоциты. Генерация осуществляется с помощью ферментного комплекса НАДФН-оксидазы. Весь ферментативный комплекс состоит из нескольких субъединиц. В покоящейся клетке эти субъединицы разобщены и распределены между плазматической мембраной и цитозолем. Во время активации клетки каким-либо стимулом запускается каскад внутриклеточных посредников, сопровождающийся стремительным входом ионов кальция в клетку, активацией протеинкиназы С, фосфолипазы A_2 , что приводит к фосфорилированию белков $p47-phox$ и $p67-phox$ и сборке мембранного комплекса НАДФН оксидазы и активный синтез супероксидного радикала. В эксперименте активацию клетки вызывают воздействием различных стимулов, которые подразделяют на корпускулярные (частицы

латекса, опсонизированный и неопсонизированный зимозан, бактерии и их компоненты, активированный уголь) и растворимые агенты (фМЛФ, аллергены, пирогенал). Указанные индукторы воздействуют через рецепторный аппарат фагоцита. Безрецепторная активация клеток достигается после воздействия кальциевого ионофора А 23187 или активатором ПкС ФМА, который проникает в клетку за счёт пассивной диффузии

Оценка удельной активности нейтрофила: при определении удельной спонтанной активности нейтрофила $A_{\text{сп}}^*$ в группе К3 значения были выше в 4,5 раза по отношению к НБ ($p = 0,007$), по отношению к УПБ в 2,1 раз, по отношению к группе К1 в 2,4 раза, однако различия не достоверны. Удельная пиковая активность нейтрофила в ответ на стимул ФМА была также достоверно выше у К3 по сравнению с НБ в 8 раз ($p = 0,001$), в 4,7 раз к К1 ($p = 0,0027$) и в 3,7 раз по отношению к УПБ ($p = 0,001$). Удельная активность в ответ на стимул фМЛФ статистически значимо выше в группе УПБ по отношению к НБ в 2,4 раза ($p = 0,003$), в 2,5 раз по отношению к К3 ($p = 0,05$), в 1,7 раз относительно К1 ($p = 0,003$). Суммарная удельная радикал-продуцирующая активность нейтрофила была достоверно выше в группе УПБ по отношению к НБ в 2 раза ($p = 0,002$), в 2,6 раз относительно К3 ($p = 0,01$) и в 1,8 раз относительно К1 ($p = 0,004$).

Таким образом, удельная спонтанная активность нейтрофилов, а также удельная пиковая активность в ответ на стимул ФМА достоверно выше в группе пациенток после самопроизвольного выкидыша, что указывает на высокую генерацию АФК нейтрофилами в момент выкидыша. Удельная пиковая активность в ответ на стимул фМЛФ и суммарная активность нейтрофила была выше в группе беременных с угрозой прерывания, что говорит о высокой радикалпродуцирующей способности нейтрофилов к генерации АФК на фоне угрозы прерывания (преимущественно за счет внутриклеточной продукции).

Оценка интегральной активности нейтрофила: При оценке интегральной спонтанной активности нейтрофилов а в группе УПБ выше в 2,6 раз по отношению к НБ. В группе К3 выше в 5,1 раз относительно группы НБ, в 1,86 раз выше чем К2, в 2,5 раз относительно К1 и в 1,9 раз выше УПБ. В группе К2 $A_{\text{сп}}$ в 2,7 раз выше чем в НБ.

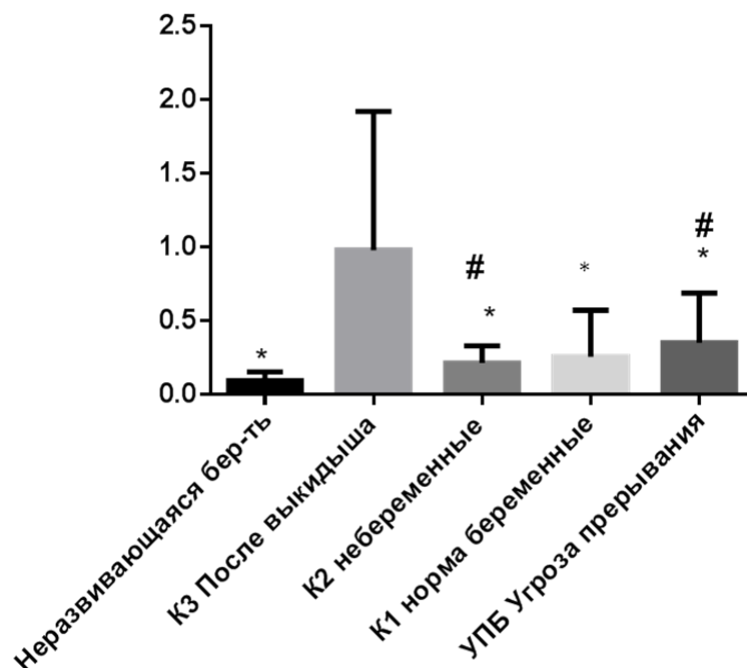


Рисунок 1. Оценка интегральной спонтанной активности нейтрофила A_{sp} по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. * относительно К3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,005$; # относительно НБ $p < 0,01$.

Таким образом, пациенты, беременность которых протекает на фоне угрозы прерывания, а также пациенты после самопроизвольного аборта характеризуются высокой спонтанной активностью нейтрофилов, при этом у пациентов с неразвивающейся беременностью, напротив, отмечалась сниженная активность, указывающая на иммуносупрессию.

При сравнительном анализе параметра $A_{ФМА}$ статистически значимые различия были выше в группах К3 по отношению к НБ в 10 раз, по отношению к К2 в 9,6 раз, к К1 в 7,7 раз, к УПБ в 4,8 раз ($p < 0,03$), значения в УПБ выше НБ в 2 раза, К2 в 1,9 раз ($p < 0,02$)

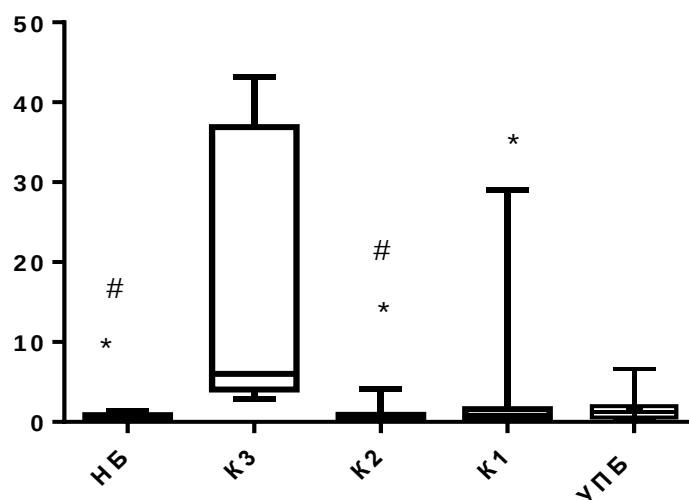


Рисунок 2. Оценка интегральной спонтанной активности нейтрофила по группам в ответ на стимул ФМА. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. * относительно К3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,03$; # относительно УПБ $p < 0,02$.

Таким образом, интегральная спонтанная активность в ответ на стимул ФМА был достоверно выше у пациентов после самопроизвольного выкидыша и угрозы прерывания, что указывает на праймирование нейтрофилов и напряженность лейкоцитарного звена иммунитета в результате родовой деятельности. Напротив, при неразвивающейся беременности был самый низкий ответ. Отсутствие реакции на стимул указывает на слабую способность нейтрофилов к генерации АФК.

Суммарная интегральная активность в ответ на стимул фМЛФ достоверно выше в группе УПБ по отношению к К1, К2, НБ более чем в 2 раза ($p < 0,001$). В группе К3 достоверно выше, чем в К2 и НБ более чем в 1,6 раз ($p < 0,01$) (рис.3).

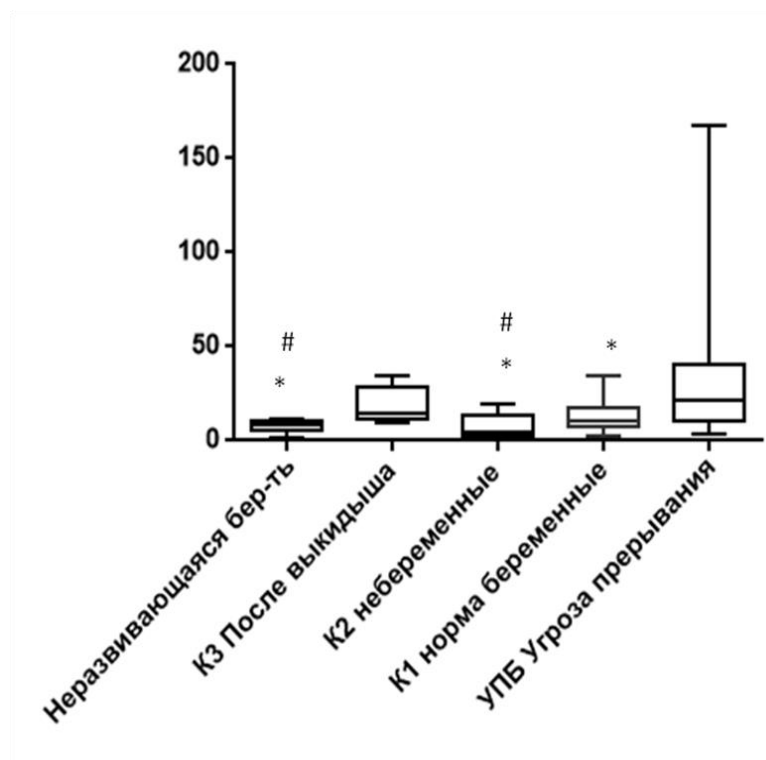


Рисунок 3. Оценка интегральной активности нейтрофила по группам в ответ на стимул ФМЛФ. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах.

Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. * относительно УПБ критерий Манна-Уитни, $p < 0,001$; # относительно К3 $p < 0,01$, К1 относительно НБ $p = 0,03$.

Таким образом, интегральная спонтанная активность в ответ на стимул ФМЛФ достоверно выше у беременных с угрозой прерывания, что указывает на высокую способность нейтрофилов к генерации АФК и возможное преждевременное прерывания беременности. После самопроизвольного выкидыша способность к дальнейшей генерации АФК снижается, что свидетельствует о расходе потенциала нейтрофилов после родовой деятельности. У пациентов с неразвивающейся беременностью, также как и при стимулировании ФМА был отмечен самый низкий ответ.

Коэффициент затухания респираторного взрыва нейтрофилов оказался статистически значимо выше у больных с УПБ по сравнению с группами контроля К1, К2, К3 (рис.4) ($p < 0,01$), у К1 по отношению к К3 ($p < 0,02$)

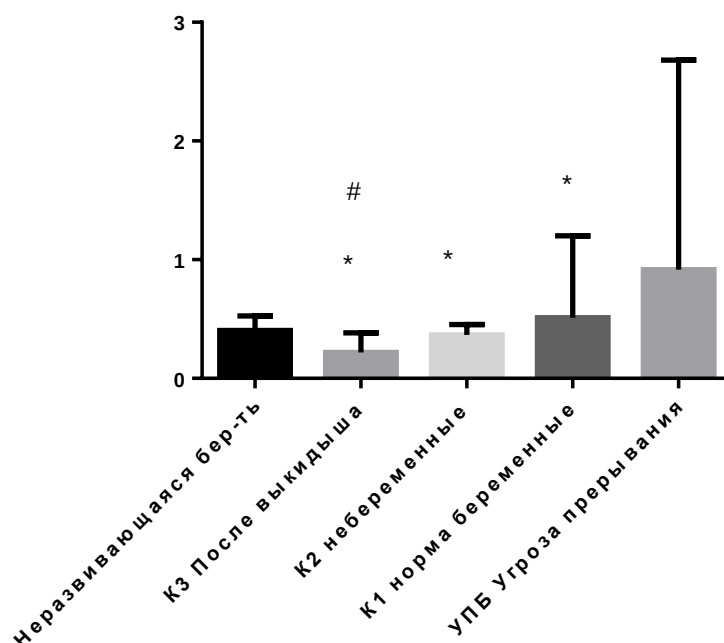


Рисунок 4. Сравнительная характеристика коэффициента затухания респираторного взрыва по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. *относительно УПБ критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$; # K1 vs K3 ($p < 0,01$);

Коэффициент активации был достоверно выше в группе УПБ по сравнению с К3 и К2 ($p < 0,0001$). У группы контроля К2, К1 и НБ достоверно значимые различия были выше по отношению к К3 ($p < 0,002$) (рис .5).

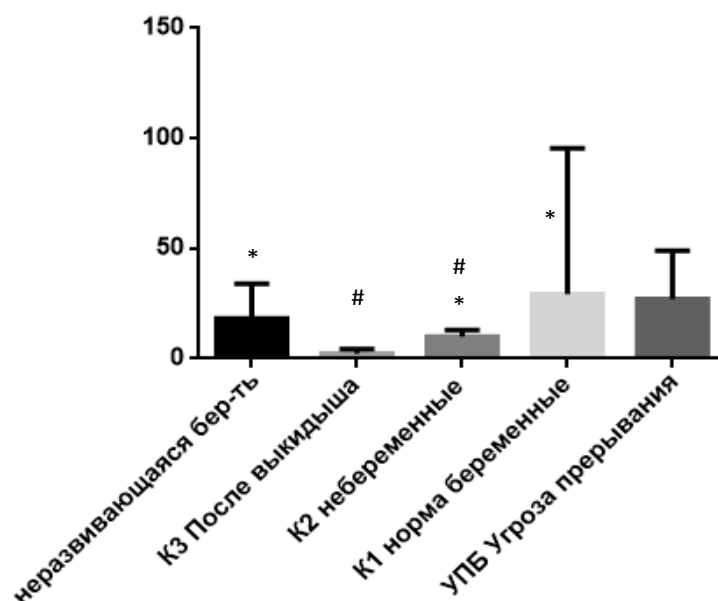


Рисунок 5. Сравнительная характеристика коэффициента активации нейтрофилов по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. *относительно K3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$; K1 vs K2 ($p < 0,01$); НБ относительно K2 ($p < 0,003$).

Коэффициент праймирования был достоверно выше во всех группах беременных женщин относительно K2. Самые высокие показатели $K_{\text{прайм}}$ были у пациентов после выкидыша (рис.6).

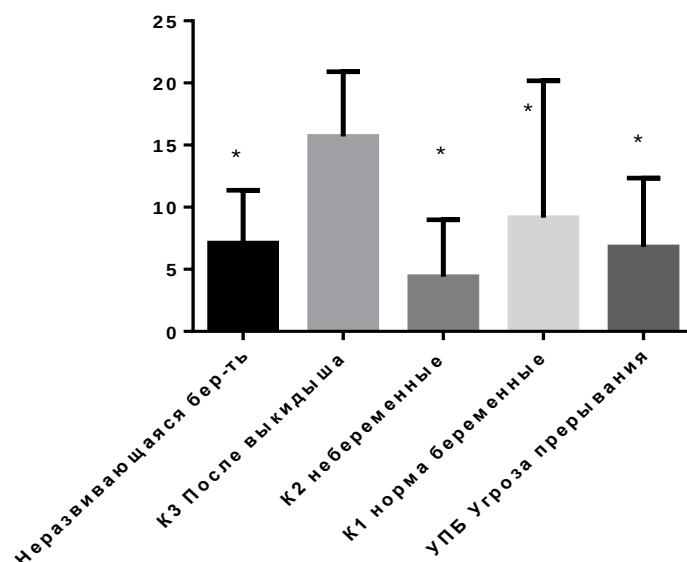


Рисунок 6. Сравнительная характеристика коэффициента праймирования нейтрофилов по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. *относительно К3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$; К1 vs К2 ($p < 0,01$); НБ относительно К2 ($p < 0,003$).

На основании анализа ХЛ кривых можно предположить, что во время беременности, как физиологической, так и протекающей на фоне угрозы прерывания, нейтрофилы находятся в состоянии прайминга. Во всех группах $K_{прайм}$ был достоверно выше, по сравнению с небеременными женщинами.

В группе пациенток после самопроизвольного выкидыша интенсивность спонтанной ХЛ выше, а $K_{акт}$ ниже по сравнению с группами К1 и К2 (критерий Манна-Уитни, $p < 0,001$), что говорит о высокой активности нейтрофильного звена иммунной системы у женщин перед и сразу после выкидышем. В результате стимуляции фМЛФ у данной группе заметно снижение ответа, что указывает на истощение радикал-продуцирующей способности нейтрофила после выкидыша. Коэффициент затухания респираторного взрыва нейтрофилов, а также ответ на стимулы, оказался статистически значимо выше у беременных с угрозой прерывания. У пациентов после самопроизвольного аборта K_d достоверно ниже, чем в группе с физиологической беременностью. Эти данные свидетельствуют о напряженности иммунитета у женщин, беременность которых протекает на фоне выраженной угрозы, и являются возможными предикторами преждевременной родовой деятельности. Снижение коэффициента затухания у пациентов после выкидыша, вероятно, указывают на функциональную недостаточность и истощение нейтрофилов.

В группе женщин с неразвивающейся беременности показатели удельной, интегральной спонтанной и стимулированной активности нейтрофилов были достоверно ниже, чем в остальных группах, что указывает на иммуносупрессивное состояние, препятствующее сократительной активности матки. Также у 2 пациенток из группы УПБ с низким ответом на стимулы в последующем происходило замирание плода. Таким образом, является неоспоримым вклад активированных нейтрофилов в патофизиологические процессы, приводящие к прерыванию беременности.

Анализ кривых методом деконволюции: кинетическая кривая ХЛ при двухстадийной стимуляции имеет сложный характер и может быть математически обработана с целью разложения на составляющие контуры методом деконволюции. Любая кривая может быть разложена на три составляющие: 1) ФМА-индуцированная продукция АФК, 2) «быстрая» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная внеклеточной продукцией АФК через рецепторный путь, 3) «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка, обусловленная внутриклеточной продукцией АФК. Результаты деконволюции для ХЛ-ответа нейтрофилов у пациента с привычным невынашиванием представлены на рис 7.

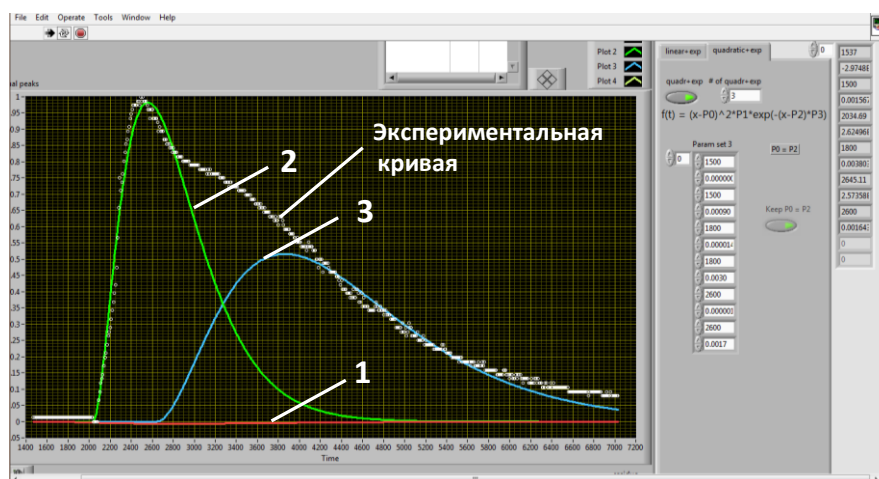


Рисунок 7. Скриншот программного модуля обработки кинетических кривых ХЛ: 1 — ФМА- индуцированная ХЛ, 2 — «быстрая» фМЛФ-стимулированная вспышка, 3 — «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка.

Из рисунка видно, что интенсивность процесса внутриклеточной генерации АФК (кривая 3) высока, что свидетельствует о развивающемся иммунном ответе.

Результаты деконволюции для ХЛ-ответа нейтрофилов у пациента с неразвивающейся беременностью представлены на рис 8.

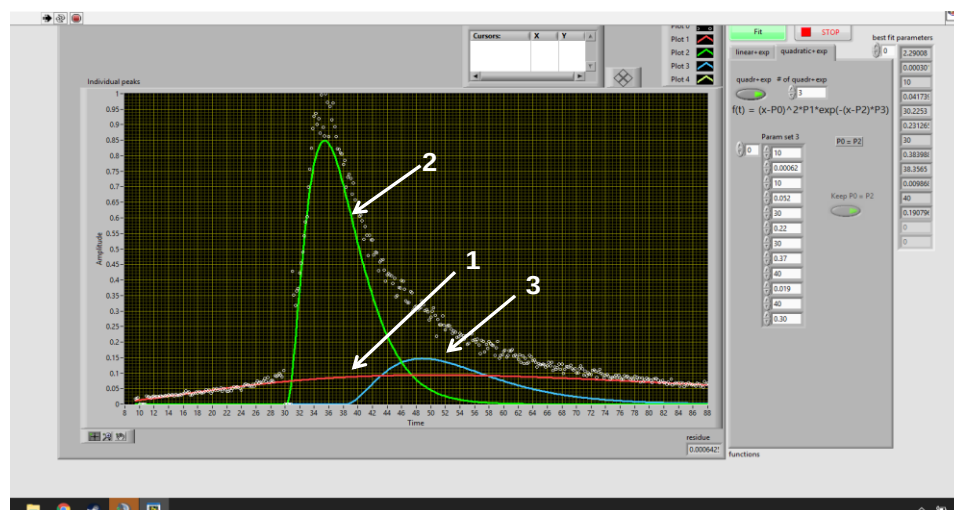


Рисунок 8. Скриншот программного модуля обработки кинетических кривых ХЛ: 1 — ФМА-индуцированная ХЛ, 2 — «быстрая» фМЛФ-стимулированная вспышка, 3 — «медленная» фМЛФ-индуцированная вспышка.

Полученная кинетическая кривая аналогична кривым практически здоровых доноров — в ней присутствуют три составляющие, причем эти составляющие характерны для отсутствия ответа со стороны нейтрофильного звена иммунной системы. В частности, кривая 3 — внутриклеточная продукция АФК — выражена даже слабее, чем у здорового донора.

Оценка антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической хемилюминесценции: у пациентов после самопроизвольного аборта отмечалось достоверное снижение АОА по сравнению с группой К2 ($p = 0,004$) и УПБ ($p = 0,04$). Это может свидетельствовать об истощении антиоксидантной емкости плазмы крови перед выкидышем, либо вследствие него (рис. 9). Напротив, более высокий уровень АОА отмечался у группы пациентов с неразвивающейся беременностью, а также у двух пациентов из группы УПБ с последующим замиранием плода.

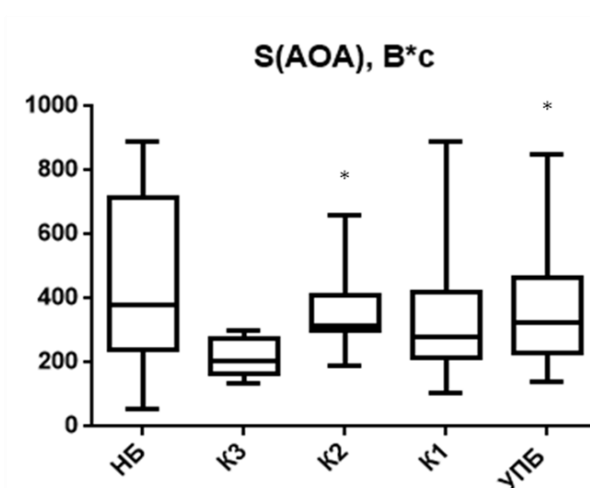


Рисунок 9. Диаграмма типа «ящик с усами». Сравнительная характеристика параметра S (АОА) по группам. Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. *относительно КЗ критерий Манна-Уитни, $p < 0,04$.

В обследованной группе здоровых женщин ($n = 22$) определены границы референсного интервала, куда попали 95% показателей — границы нормы, которые составили от 195 до 405 усл.ед, медиана 320. Из сопоставления данных следует, что в группе здоровых беременных есть случаи, выходящие за пределы нормальных значений, как в меньшую, так и в большую сторону.

На основании анализа ХЛ кривых можно предположить, что во время самопроизвольного аборта происходит снижение антиоксидантной емкости плазмы. Эти данные косвенно свидетельствуют о развитии окислительного стресса в момент выкидыша в тканях фето-плацентарной системы и резком спаде уровня прогестерона. Повышение АОА в группе с неразвивающейся беременностью возможно связано с накоплением различных токсических веществ с антиоксидантными свойствами, являющихся продуктом лизиса погибшего эмбриона, а также с гормональной поддерживающей терапией препаратами прогестерона, обладающими иммуносупрессивными эффектами. У двух пациентов из группы УПБ с последующим замиранием плода отмечался более высокий уровень АОА, что может являться прогностическим фактором. Эти данные указывают на необходимость определения эндогенного уровня прогестерона и индивидуального подхода к подбору дозировки и длительности терапии. Из сопоставления данных следует, что в группе здоровых беременных есть случаи, выходящие за пределы нормальных значений, как в меньшую,

так и в большую сторону. Возможно, для женщин со сниженной АОА требуется терапия антиоксидантами. Повышенные значения могут свидетельствовать или о компенсации оксидативного стресса, или быть следствием несбалансированной гормональной терапии.

Оценка триптофановой флуоресценции альбумина: для оценки окислительного статуса при различных патологических состояниях и заболеваниях в последнее время проводят измерение доли окисленного альбумина, как маркера системного оксидативного стресса. Сывороточный альбумин может выступать в качестве, как источника, так и мишени свободных радикалов. Перехватывая свободные радикалы, альбумин подвергается окислительной модификацией и теряет свои транспортные свойства. Окисленная модификация белка вызывает образование в организме продуктов окисления тирозина и триптофана. Степень окисленности альбумина в эксперименте оценивали по изменению его флуоресценции при 353 нм (флуоресценция триптофана). При сравнительной характеристике ДОА (рис 10) в группе женщин после самопроизвольного выкидыша достоверно ниже по отношению к К2 ($p = 0,02$), по отношению к К1 ($p = 0,06$)

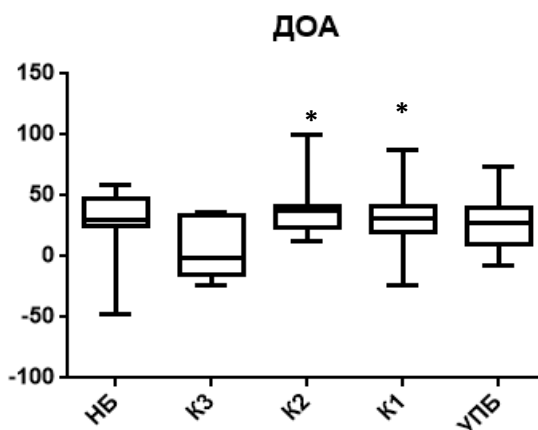


Рисунок 10. Сравнительная характеристика параметра ДОА по группам.

Значения представлены в виде медиана $\pm$ межквартильный размах. Для оценки различий между группами использовали тест Манна-Уитни. * относительно К3 критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$.

В некоторых случаях показатель ДОА принимал отрицательные значения, что свидетельствовало о наличии белковых компонентов, вносящих вклад в триптофановую флуоресценцию. При сравнении групп К1 и К2 не было выявлено статистически значимых различий, однако в группе К2 отмечался больший разброс в значениях: размах

варьирования для K1 (-24–88), медиана 31, для K2 (12–43), медиана 37. У трех пациентов были отрицательные значения, а в пяти случаях значения были выше нормы ($> 60\text{г/л}$). Наибольшие отрицательные значения ДОА были в группе после самопроизвольного выкидыша, что подтверждает роль провоспалительных цитокинов в инициации родовой деятельности.

ВЫВОДЫ

1. Состояние физиологической беременности характеризуется активацией нейтрофильного звена иммунитета по сравнению с небеременными женщинами, оцененной по люминол-активированной хемилюминесценции с двухстадийной стимуляцией: коэффициент праймирования нейтрофилов $K_{\text{прайм}}$ медиана нормы небеременных женщин 2,8, межквартильный размах 2–4,4, медиана здоровых беременных 4,9, межквартильный размах 26–11,3, по критерию Манна-Уитни $p = 0,01$
2. При неразвивающейся беременности уровень базальной и стимулированной ФМА и ФМЛФ продукции радикалов нейтрофилами крови был достоверно ниже, чем у здоровых беременных и беременных с угрозой прерывания, что указывает на сниженную активность нейтрофильного звена иммунитета. По критерию Манна-Уитни $p < 0,02$.
3. Непосредственно сразу после выкидыша базальная и ФМА-стимулированная продукция радикалов нейтрофилами достоверно выше более чем в 7 раз по сравнению со здоровыми беременными и более чем в 4 раза по сравнению с пациентами с угрозой прерывания. Отсутствие дальнейшего роста кривой в результате стимулирования ФМЛФ указывает на истощение радикал-продуцирующей способности нейтрофилов в результате сократительной активности матки и свидетельствует об участии свободнорадикальных процессов в инициации родовой деятельности.
4. У женщин с выраженными признаками угрозы прерывания и последующим выкидышем или преждевременными родами отмечалась повышенная ФМЛФ стимулированная продукция активных форм кислорода относительно беременных с физиологическим течением беременности: медиана беременных с угрозой прерывания 21,8, межквартильный размах 10,64–40,93, медиана здоровых беременных 10,8, межквартильный размах: 7,1–17,9. Также, беременность, протекающая на фоне угрозы прерывания, характеризуется повышением коэффициента затухания респираторного взрыва в 1,8 раз относительно здоровых беременных. По критерию Манна-Уитни $p = 0,01$. Повышенная радикал-продуцирующая способность нейтрофилов у беременных с привычным невынашиванием и угрозой прерывания может являться возможным предиктором преждевременной родовой деятельности.

5. При оценке триптофановой флуоресценции альбумина было установлено, что при физиологической беременности и беременности с угрозой прерывания не развивается системного оксидативного стресса, затрагивающего белковое звено.

6. В группах здоровых женщин, здоровых беременных женщин и с угрозой прерывания антиоксидантная емкость плазмы различается незначимо, однако при выкидыше этот показатель снижается, что свидетельствует о расходовании антиоксидантов крови из-за развивающегося оксидативного стресса в момент прерывания беременности, а при замершей беременности, наоборот, повышен. Повышение у беременных с привычным невынашиванием антиоксидантной активности плазмы крови выше 320 ед и отсутствие ответа на стимулы является прогностически неблагоприятным фактором, указывающим на высокую вероятность замирания беременности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В комплексное обследование женщин с привычным невынашиванием беременности помимо общепринятых методов рекомендовано включение хемилюминисцентных методик оценки функционального состояния нейтрофилов, антиоксидантной активности плазмы крови и определение доли окисленного альбумина. Эти методики являются простыми, экспрессными и недорогими, и могут быть использованы в рутинной клинической практике.

2. Величина активности радикал-продуцирующей способности нейтрофилов и антиоксидантной активности плазмы имеют важное значение для прогноза течения беременности. Снижение базальной и стимулированной радикал-продуцирующей способности нейтрофилов и повышение антиоксидантной активности плазмы крови выше 320 ед на ранних сроках беременности позволит спрогнозировать возможное замирание беременности, напротив высокая активность нейтрофилов указывает на большую вероятность прерывания беременности.

3. При высокой способности нейтрофилов к генерации АФК рекомендовано включение в комплексную консервативную терапию антиоксидантов и проведение рациональной иммуннокоррекции. Учитывая возможные антиоксидантные эффекты препаратов прогестеронового ряда, необходим персонализированный подход к назначению и дозированию гормональной терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Покаленьева М.Ш.** Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов при привычном невынашивании беременности: применение метода активированной хемилюминесценции с двойной стимуляцией/М.Ш.Покаленьева, А.М.Нестерова, Е.А.Соснова, С.Б.Болевич, Е.В.Проскурнина//**Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии**, 2017.- Т. 16, №5.- С. 82–88.
2. **Покаленьева М.Ш.** Патофизиологическая роль свободнорадикальных процессов при невынашивании беременности/ Е.А.Соснова, С.Б. Болевич, М.Ш. Покаленьева// **Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева**. 2016.-№ 3 (3).-С. 136-140.
3. **Покаленьева М.Ш.** Оксидативный статус плазмы крови при привычном невынашивании беременности/ М.Ш.Покаленьева, А.М.Нестерова, Е.А.Соснова, С.Б.Болевич, Е.В.Проскурнина// **Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева**. 2017.- Т.4, С. 214-219.
4. **Покаленьева М.Ш.** Радикал - продуцирующая функция нейтрофилов при привычном невынашивании беременности: применение метода активированной хемилюминесценции с двойной стимуляцией./ М.Ш. Покаленьева, А.М.Нестерова, Е.А.Соснова, С.Б.Болевич, Е.В.Проскурнина//
XXX Юбилейный международный конгресс с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» Москва 2017. –С. 83-84.
5. **Покаленьева М.Ш.** Параметры плазмы крови как показатели оксидантного статуса при привычном невынашивании беременности./ М.Ш. Покаленьева, А.М.Нестерова, В.Ю. Яроцкая, С.Д. Нечаева, Е.А.Соснова, С.Б.Болевич, Е.В.Проскурнина// XXX Юбилейный международный конгресс с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» Москва 2017.- С. 85-86.
6. **Покаленьева М.Ш.**Патофизиологическая роль свободнорадикальных процессов при привычной потере плода./ Е.А.Соснова, С.Б.Болевич, М.Ш. Покаленьева.//Российская научно-практическая конференция с международным участием: «Снегиревские чтения-2016». День молодых исследователей. Москва. С. 43-44.
7. **Покаленьева М.Ш.** Новый хемилюминесцентный метод оценки функциональной активности нейтрофилов при привычном невынашивании./ М.Ш. Покаленьева, А.М.Нестерова, Е.А.Соснова, С.Б.Болевич, Е.В.Проскурнина// XXVII Ежегодная международная конференция РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» Санкт-Петербург. -2017.- С. 103-105.