

и.ж.

№ 8, т. 13, 2016

ТЕХНОЛОГИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ



Редактор А. А. Камалов

В номере:

Роль прямых контактов мезенхимных стромальных клеток с эндотелиальными клетками в формировании сосудоподобных структур *in vitro*

Автоматизированная неконтактная оценка психоэмоционального состояния говорящего: подходы и технологии

и др.



тел./факс: +7(495) 625-92-41
<http://www.radiotec.ru>

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС 84233 В КАТАЛОГЕ АГЕНТСТВА "РОСПЕЧАТЬ": ГАЗЕТЫ И ЖУРНАЛЫ

© Авторы, 2016
 © ООО «Издательство
 «Раднотехника», 2016

**Елена Васильевна
 Проскурнина** –
 к.х.н., доцент, кафедра
 медицинской биофизики,
 факультет
 фундаментальной медицины,
 МГУ им. М.В. Ломоносова
 E-mail: proskurnina@gmail.com

**Аида Ержановна
 Шеримова** –
 аспирант, кафедра внутренних
 болезней, факультет
 фундаментальной медицины,
 МГУ им. М.В. Ломоносова
 E-mail: sherim@list.ru

**Анастасия Михайловна
 Полимова** –
 к.б.н., науч. сотрудник,
 Федеральный
 научно-исследовательский
 центр «Кристаллография
 и фотоника» РАН
 (Москва)
 E-mail: corason27@mail.ru

**Мадина Магамедовна
 Созарукова** –
 аспирант, кафедра медицинской
 биофизики, факультет
 фундаментальной медицины,
 МГУ им. М.В. Ломоносова
 E-mail: s_madinam@bk.ru

**Галина Алексеевна
 Владимирова** –
 к.б.н., доцент, кафедра
 медицинской биофизики,
 факультет фундаментальной
 медицины,
 МГУ им. М.В. Ломоносова
 E-mail: obgavladimirova@yandex.ru

**Татьяна Николаевна
 Краснова** –
 к.м.н., доцент,
 кафедра внутренних болезней,
 факультет
 фундаментальной медицины,
 МГУ им. М.В. Ломоносова
 E-mail: krasnovamgu@yandex.ru

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**

Проведена оценка окислительного стресса у пациентов с АНЦА-ассоциированными системными васкулитами (ГПА, ЭГПА и МПА) при помощи трех новых методик: хемилюминесцентный анализ радикал-продуцирующей активности нейтрофилов как источника активных форм кислорода (АФК), флуоресцентный анализ окисленного альбумина как мишени действия АФК и хемилюминесцентный анализ антиоксидантной активности плазмы.

Ключевые слова: окислительный стресс, системные васкулиты, нейтрофилы, окисленный альбумин, хемилюминесценция.

Oxidative stress of the patients with ANCA-associated systemic vasculitis (GPA, EGPA and MPA) were evaluated using three new methods: chemiluminescent analysis of radical-producing activity of neutrophils as a source of reactive oxygen species, the fluorescent analysis of oxidized albumin as a target of action of reactive oxygen species, and chemiluminescence analysis of antioxidant activity of blood plasma.

Keywords: oxidative stress, ANCA-associated vasculitis, neutrophils, oxidized albumin, chemiluminescence.

Системные васкулиты, ассоциированные с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА-СВ), включают в себя: гранулематоз с полиангиитом (Вегенера; ГПА), микроскопический полиангиит (МПА), эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ЭГПА). Это группа аутоиммунных заболеваний, при которых развивается воспалительное поражение сосудов малого калибра. Наиболее угрожающим осложнением при АНЦА-ассоциированных васкулитах считается вовлечение почек и легких [1, 2].

В патогенезе АНЦА-СВ участвуют различные типы клеток, в первую очередь нейтрофилы [3, 4], моноциты [5, 6], Т-клетки и В-клетки [7 – 9], особенности межклеточных взаимодействий которых во многом не расшифрованы. Центральное значение в повреждении сосудистой стенки играет индуцированная АНЦА активация нейтрофилов с их дегрануляцией, высвобождением протеолитических ферментов и активных форм кислорода (АФК) [10].

Несмотря на внедрение современных клинико-лабораторных и инструментальных диагностических методов, разрабо-



танных расчетных критериев для диагностики и степени повреждения органов, оценка активности АНЦА-СВ представляет трудности, особенно при контроле эффективности терапии.

Учитывая ключевую роль нейтрофилов в развитии окислительного стресса при АНЦА-СВ, представляется целесообразной оценка их функционального статуса и вклада в определение активности болезни. Для оценки глубины окислительного стресса также необходимо определить антиоксидантную активность плазмы крови и степень окислительной модификации альбумина – основной мишени свободных радикалов в крови.

Цель работы – оценка уровня окислительного стресса у пациентов с системным васкулитом, ассоциированным с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА-СВ).

Для решения этой задачи были разработаны новые люминесцентные методы [11,12].

Материалы и методы

В проспективное исследование были включены 40 больных с АНЦА-ассоциированным системным васкулитом, которые наблюдались в Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных заболеваний им. Е.М. Тареева Первого МГМУ им. И.М. Сеченова с 2012 по 2015 гг. Диагноз устанавливался соответственно критериям Американской коллегии ревматологов. Абсолютными критериями включения являлись: острый процесс или обострение хронических воспалительных заболеваний (инфекционный процесс), онкологическое заболевания, алкогольная болезнь.

Группой контроля служили доноры из Гематологического научного центра МЗ РФ (для определения антиоксидантной активности плазмы и доли окисленного альбумина, $n = 40$) и отделения трансфузиологии НИИ Скорой помощи им. Н.В.Склифосовского (для определения функциональной активности нейтрофилов, $n = 87$). Средний возраст группы доноров составлял $32,4 \pm 11,0$ лет.

Среди 40 больных (10 мужчин и 30 женщин в возрасте 18–80 лет) с АНЦА-ассоциированными системными васкулитами у 31 человека был диагностирован ГПА, у пяти – МПА, у четырех – ЭГПА. При анализе течения болезни выделяли локальный (поражение верхних дыхательных путей, органа зрения и слуха) и генерализованный (поражение верх-

них дыхательных путей, органа зрения и слуха в сочетании с поражением легких и/или почек, а также желудочно-кишечного тракта, нервной системы, кожи) варианты.

Обследование больных проводилось по стандартам для больных васкулитами и включало в себя изучение анамнеза, физическое обследование, лабораторные и инструментальные анализы.

Инструментальное обследование включало электрокардиографию, рентгенографию и компьютерную томографию органов грудной клетки, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, риноскопию, рентгенологическое исследование и компьютерную томографию придаточных пазух носа, эзофагогастроуденоскопию, колоноскопию, компьютерную томографию черепа, гортани и трахеи.

Всем пациентам проводили общий анализ крови, общий анализ мочи, определение суточной протеинурии, биохимический анализ крови (с определением уровней глюкозы натощак, креатинина, мочевой кислоты, общего холестерина, липопротеинов высокой (ЛВП), низкой (ЛНП) и очень низкой плотности (ЛОНП), триглицеридов (ТГ)), определение С-реактивного белка (СРБ).

Иммуноферментным методом определяли концентрацию двух подтипов АНЦА — к протеиназе-3 (сАНЦА) и миелопероксидазе (рАНЦА).

Активность васкулита оценивали с использованием индекса активности BVAS (*Birmingham Vasculitis Activity Score*, версия 3.0). Тяжесть необратимого поражения органов оценивали с помощью индекса VDI (*Vasculitis Damage Index*). Прогноз у больных системными некротизирующими васкулитами оценивали по индексу FFS (*Five-Factor Score*).

Оценка окислительного стресса. Исследование окислительного статуса крови проводилось с применением следующих методов:

Определение антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической люминол-активированной хемилюминесценции [12]. Для оценки антиоксидантной активности (АОА) плазмы крови использовали методику, основанную на подавлении хемилюминесценции (ХЛ). В качестве источника свободных радикалов в системе использовали 2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП; Fluka). В качестве хемилюми-



несцентного зонда использовали люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталевой кислоты, Sigma-Aldrich).

Хемилюминесцентный анализ плазмы проводили на однокветном хемилюминометре SmartLum 100 (ДИСофт, Россия). В микропробирку объемом 1,5 мл помещали 50,0 мкл 50 мМ раствора АБАП и 20,0 мкл 0,1 мМ люминола. Смесь перемешивали в течение 2 мин на встряхивателе «Vortex yellow line tts2» при частоте 1400 об/мин и инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре. Образование свободных радикалов в системе инициировали добавлением в кювету 930 мкл нагретого (37 °С) фосфатного буферного раствора (100 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4; Sigma, США). Регистрировали свечение до достижения стационарного уровня (I_0) при 37 °С, затем добавляли 10 мкл плазмы крови, предварительно разбавленной в 10 раз. После добавления плазмы крови свечение прекращалось благодаря нейтрализации радикалов антиоксидантами плазмы крови, прежде всего, мочевой кислотой. После расходования антиоксидантов свечение вновь нарастало и достигало нового стационарного уровня I (рис. 1). В качестве аналитического сигнала использовали $S(\text{AOA})$ – площадь над кривой, «вырезаемая» антиоксидантами.

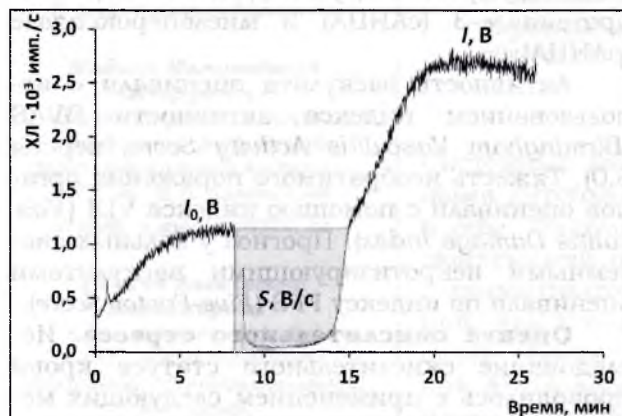


Рис. 1. Типичная кривая развития ХЛ при исследовании антиоксидантных свойств плазмы крови

Оценка функциональной активности фагоцитов крови методом люминол-активированной хемилюминесценции [11]. Методический подход для оценки функциональной активности нейтрофилов и моноцитов в цельной крови основан на регистрации развития во времени свечения клеток, стимулированных последовательно двумя веще-

ствами с разным механизмом действия. На первом этапе клетки стимулировали форбол-12-миристал-13-ацетатом (ФМА) с внутриклеточным механизмом действия, на втором этапе проводили основную стимуляцию формил-метиониллейцил-фенилаланином (фМЛФ) с внеклеточным механизмом действия. Двойная стимуляция приводит к максимально полному ответу фагоцитирующих клеток, следовательно, к улучшению чувствительности и точности получаемых результатов.

В кювету, содержащую раствор Хенкса, стабилизированный HEPES (Sigma-Aldrich), 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) и регистрировали спонтанную ХЛ в течение 12 мин, затем вносили стимул ФМА (конечная концентрация в кювете – 50 нг/мл). После 20 мин инкубации проводили стимуляцию фМЛФ (конечная концентрация – 10 мкМ) и регистрировали индуцированную ХЛ ответ в течение не менее 60 мин (рис. 2).

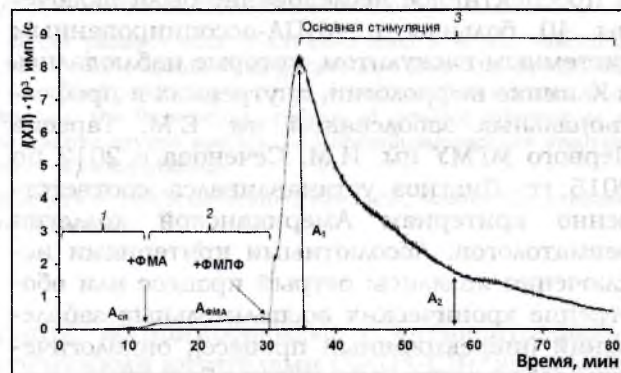


Рис. 2. Типичная кривая развития ХЛ при двойной стимуляции нейтрофилов: 1 – спонтанная ХЛ; 2 – предстимуляция ФМА; 3 – основная стимуляция фМЛФ. Стрелками обозначены моменты добавления стимулов

Строго говоря, методика дает возможность оценить радикал-продуцирующую активность всех фагоцитирующих клеток крови, включая моноциты. В дальнейшем, для простоты изложения, в тексте будут упоминаться только нейтрофильные гранулоциты, поскольку их вклад в продукцию свободных радикалов является преобладающим.

Изучали аналитические показатели:

1) удельную пиковую активность нейтрофила A_1^* (амплитуда фМЛФ-индуцированной ХЛ A_1 , деленная на число нейтрофилов);



2) удельную интегральную активность нейтрофила S^* (светосумма вспышки фМЛФ-индуцированной ХЛ за 30 мин после добавления фМЛФ, деленная на число нейтрофилов);

3) суммарную радикал-продуцирующую активность клеток крови S (светосумма вспышки фМЛФ-индуцированной ХЛ за 30 мин после добавления фМЛФ);

4) коэффициент затухания респираторного взрыва $K_d = (A_2/A_1)$ (где A_1 – амплитуда фМЛФ-индуцированной ХЛ, A_2 – интенсивность фМЛФ-индуцированной ХЛ на 23-й мин после добавления фМЛФ);

5) удельный уровень спонтанной ХЛ $A_{сп}^*$ (базальная радикал-продуцирующая активность нейтрофила).

Определение доли окисленного альбумина (ДОА) методом флуоресценции. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301PC (SHIMADZU, Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1,00 см.

Предварительно из плазмы крови отделяли глобулины. Для этого к 100 мкл плазмы добавляли равное количество насыщенного раствора сульфата аммония $((NH_4)_2SO_4$, Sigma-Aldrich). При этом глобулиновая фракция осаждалась, а альбуминовая оставалась в растворе. Полученную смесь перемешивали на встряхивателе, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 450 *g*. Использование сульфата аммония в качестве высаливателя не оказывало мешающего влияния на результаты спектрофлуориметрических исследований.

Полученную безглобулиновую плазму предварительно разбавляли в 500 раз в 100 мМ фосфатном буферном растворе (рН 7,4) и одновременно регистрировали спектр флуоресценции и спектр поглощения. Для расчета доли окисленного альбумина использовали формулу [13]:

$$ДОА = \frac{(I_0 - I)}{I_0},$$

где I – флуоресценция альбумина в исследуемой плазме ($\lambda_{ex} = 260$ нм, $\lambda_{max} = 335$ нм); I_0 – флуоресценция чистого альбумина в концентрации, равной концентрации альбумина в плазме, определенной биохимическим методом.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили, используя программный пакет STATISTICA.

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 непараметрического критерия Манна–Уитни или параметрического критерия Стьюдента. Различия признавали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

На момент исследования окислительного статуса у большинства больных системными васкулитами отмечались признаки активности разной степени выраженности: с высокой активностью – 9 больных (индекс BVAS 11–21), с умеренной активностью – 18 (индекс BVAS 3–10) и больные в ремиссии – 13 (индекс BVAS 0–2). Пациенты с генерализованной формой болезни – 31 чел., с локализованной – 9 чел. Больные (35 чел.) получали иммуносупрессивную индукционную или поддерживающую ремиссию терапию; 5 больных не получали медикаментозную терапию (впервые поступившие в стационар). При этом с активной стадией болезни повышенный титр АНЦА был определен у 10 больных (рАНЦА – у 4, сАНЦА – у 7), у 19 больных антитела в пределах нормальных значений и у остальных больных антитела не определяли.

Определение антиоксидантной активности плазмы. Проверка нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилка: группа контроля – $W = 0,92$, $p = 0,200$, $n = 35$; группа пациентов – $W = 0,790$, $p = 0,00001$, $n = 40$. Таким образом, распределение в исследуемой группе не является нормальным, и последующий анализ проводили по непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Сравнение мужчин и женщин в группе контроля: $p = 0,35$, в группе пациентов $p = 0,26$. Таким образом, различия в группах являются незначимыми, и в дальнейшем рассматривали объединенные по полу выборки.

У больных АНЦА-СВ антиоксидантная активность была выше по отношению к группе контроля ($p = 0,009$).



Внутри группы пациентов с АНЦА-СВ проводили сопоставление показателей по группам: а) с локализованной и генерализованной формами; б) с активным (BVAS > 2) и неактивным (BVAS от 0 до 2) течением болезни; в) с АНЦА-позитивной и АНЦА-негативной формами; г) ГПА, ЭГПА, МПА. При всех вариантах сравнения, значимых отличий по АОА найдено не было.

Референтный интервал для АОА я (интервал, в который попадают 95 % значений для группы доноров) составляет $(171 - 328) \cdot 10^3$ имп. В пределы референтного интервала из группы АНЦА-СВ попали 17 чел., превышение до $2N - 15$ чел., выше $2N - 5$ чел.

Оценка радикал-продуцирующей активности нейтрофилов. Анализировали следующие параметры кривой развития ХЛ в ответ на двойную стимуляцию нейтрофилов: 1) удельную пиковую активность нейтрофила в ответ на стимул фМЛФ, A_1^* ; 2) удельную интегральную активность нейтрофила в ответ на стимул фМЛФ, S^* ; 3) коэффициент затухания респираторного взрыва, K_d ; 4) удельный уровень спонтанной ХЛ $A_{сп}^*$ (базальная радикал-продуцирующая активность нейтрофила).

Данные для контрольной группы были проверены на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. Распределение статистически значимо отличалось от нормального: $p = 0,0004$, $n = 87$. В группе не выявлено статистически значимых различий в зависимости от возраста и пола. Мы предположили, что это справедливо также для группы больных АНЦА-СВ, и рассматривали объединенную по полу выборку.

По удельной пиковой активности нейтрофила выявлено статистически значимое различие между группой контроля и АНЦА-СВ ($p = 0,001$). Параметр A_1^* ниже в группе контроля. Удельная интегральная активность нейтрофила S^* также значимо более выражена у больных АНЦА-васкулитами по сравнению с группами контроля ($p = 0,02$). Коэффициент затухания респираторного взрыва нейтрофилов оказался статистически значимо выше у больных с АНЦА-васкулитом по сравнению с группой контроля ($p = 0,006$). Удельный уровень спонтанной ХЛ в группе

АНЦА-СВ значимо выше, чем в группе контроля ($p = 0,005$).

Внутри группы пациентов с АНЦА-СВ проводили сопоставление всех показателей радикал-продуцирующей активности нейтрофилов по группам: а) с локализованной и генерализованной формами; б) с активным (BVAS > 2) и неактивным (BVAS от 0 до 2) течением болезни; в) с АНЦА-позитивной и АНЦА-негативной формами; г) ГПА, ЭГПА, МПА. При всех вариантах сравнения, значимых отличий по активности нейтрофилов найдено не было.

Определение доли окисленного альбумина. Проверка нормальности распределения по критерию Шапиро-Уилка: группа контроля - $W = 0,968$, $p = 0,646$, $n = 35$, группа пациентов - $W = 0,980$, $p = 0,89$, $n = 35$. Таким образом, распределение является нормальным, и последующий анализ проводили по t -критерию.

При сравнении мужчин и женщин в группе контроля: $p = 0,46$, а в группе пациентов $p = 0,71$. Таким образом, различия в группах являются незначимыми и в дальнейшем рассматривали объединенные по полу выборки.

Показатель ДОА значимо выше в группе АНЦА-СВ (среднее ДОА - 0,48, $S_r = 0,28$), чем в группе здоровых доноров (среднее ДОА - 0,24, $S_r = 0,16$), $p < 0,001$. Также значимо ДОА отличается в группе пациентов с генерализованным течением болезни (среднее ДОА - 0,56, $S_r = 0,22$) по сравнению с группой с локализованным течением болезни (среднее ДОА - 0,47, $S_r = 0,20$) $p = 0,04$. Сравнение групп с различными вариантами системных васкулитов не показало значимой разницы, также как и сравнение между группами АНЦА-позитивных и АНЦА-негативных васкулитов, с активной и неактивной формами.

Итоговая оценка окислительного статуса у группы пациентов АНЦА-СВ представлена в таблице.

В объединенной выборке больных ($n = 35$) корреляция была выявлена ($p < 0,05$) между следующими показателями: S^* и $S(\text{АОА})$, $r = -0,40$; $S(\text{АОА})$ и $s\text{АНЦА}$, $r = 0,41$; $S(\text{АОА})$ и стаж болезни/лечения, $r = 0,41$.



Таблица. Окислительный статус пациентов с АНЦА-СВ и практически здоровых доноров

Показатель	Группа контроля	Группа АНЦА-СВ	Вывод
Антиоксидантная активность плазмы, *10 ³ имп.	Медиана 227 *ИКР 84	Медиана 357 ИКР 146	АОА значимо выше в группе АНЦА-СВ, $p = 0,009$
Удельная пиковая активность нейтрофила, *10 ⁻² имп./(*кл.)	Медиана 4,13 ИКР 3,64	Медиана 4,55 ИКР 5,27	A ₁ * значимо выше в группе АНЦА-СВ, $p = 0,001$
Удельная интегральная активность нейтрофила, имп./кл.	Медиана 23,7 ИКР 20,3	Медиана 41,3 ИКР 34,4	S ₁ * значимо выше в группе АНЦА-СВ, $p = 0,02$
Коэффициент загущения респираторного взрыва	Медиана 0,43 ИКР 0,29	Медиана 0,30 ИКР 0,28	K _d значимо ниже в группе АНЦА-СВ, $p = 0,005$
Базальная радикал-продуцирующая активность, *10 ⁻² имп./(*кл.)	Медиана 0,27 ИКР 0,17	Медиана 0,42 ИКР 0,22	A _{сп} значимо выше в группе АНЦА-СВ, $p = 0,006$
Доля окисленного альбумина	Среднее 0,24 S _r = 0,16	Среднее 0,48 S _r = 0,28	ДОА значимо выше в группе АНЦА-СВ, $p = 0,001$

Примечание: * – ИКР – интерквартильный размах.

Корреляции. Для группы больных с высокоактивным течением процесса ($n = 16$) корреляция была выявлена ($p < 0,05$) между следующими показателями: S* и S(AOA), $r = -0,52$; S* и СРБ, $r = 0,5$; S(AOA) и сАНЦА, $r = 0,60$; S(AOA) и стаж болезни/лечения, $r = 0,40$; S(AOA) и VDI, $r = 0,54$.

Для группы больных в ремиссии ($n = 19$) корреляция была выявлена ($p < 0,05$) между следующими показателями: S* и S(AOA), $r = 0,37$; S* и BVAS, $r = 0,5$; S(AOA) и рАНЦА, $r = 0,40$; S(AOA) и стаж болезни/лечения, $r = 0,40$.

Обсуждение результатов

Непосредственными участниками патогенетического процесса при АНЦА-СВ являются: 1) нейтрофилы и моноциты, 2) В- и Т-лимфоциты, 3) аутоантитела АНЦА, 4) система комплемента, 5) инфекционный агент (*Staphylococcus aureus*) [14,15].

Нейтрофилы, с одной стороны, являются эффекторными клетками, вызывающими повреждение эндотелия, с другой – мишенью аутоиммунного ответа. Они синтезируют огромное количество цитокинов и хемокинов, служащих модуляторами воспалительного и аутоиммунного процессов. Нейтрофилы также продуцируют стимул лимфоцитов B_{ly}, цитокин, играющий важнейшую роль в физиологии В-клеток, включая дифференцировку, пролиферацию, продукцию иммуноглобулинов. Нейтрофилы больных АНЦА-СВ отличаются повышенной экспрессией субъединиц

интегринов, резэкспрессией генов, кодирующих синтез ферментов гранул, а также повышенной базальной секрецией супероксидного анион-радикала [3]. Считается, что циркулирующие в кровотоке больных нейтрофилы являются активированными.

При ГПА также активируются моноциты, что было доказано повышенным уровнем неоптерина, ИЛ-6 и экспрессии на поверхности моноцитов кластеров дифференцировки CD-64, CD-11b, причем уровень этих маркеров коррелировал с активностью болезни по BVAS [5].

В-лимфоциты являются предшественниками плазматических клеток, продуцирующих АНЦА. Их число, равно как и уровень стимулирующих В-лимфоциты факторов, повышено у больных АНЦА-СВ. Т-лимфоциты найдены в гранулах при АНЦА-СВ, и показан повышенный уровень как самих лимфоцитов, так и маркеров их активности (рецептор ИЛ-2, неоптерин, растворимый CD-30) [14].

Антинейтрофильные цитоплазматические антитела при АНЦА-СВ продуцируются к протеиназе-3 (цитоплазматические, сАНЦА) и к миелопероксидазе (перинуклеарные, рАНЦА) — компонентам, присутствующим как в первичных гранулах нейтрофилов, так и лизосомах моноцитов. Роль АНЦА многозначна. Они могут служить стимулами праймированных нейтрофилов и моноцитов, которые, активируясь, повреждают эндотелий сосудов в результате выброса протеолитиче-



ских ферментов и АФК [16]. Праймирование может возникать в результате инфекции, при этом АНЦА-антигены перемещаются из цитоплазматических гранул к поверхности мембраны нейтрофила.

Антинейтрофильные цитоплазматические антитела играют роль в апоптозе нейтрофилов. Апоптоз нейтрофилов – это ключевой механизм контроля длительности раннего воспалительного ответа, ограничивающий повреждение тканей. Одна из теорий предполагает, что аутоиммунный ответ связан с нарушением клиренса нейтрофилов, вступивших в апоптоз. Протеиназа-3, в отличие от миелопероксидазы, экстернализуется из цитоплазмы на самых ранних стадиях апоптоза. Таким образом, реализуется механизм, по которому АНЦА индуцируют активацию нейтрофилов и апоптоз, что, в свою очередь, вызывает выброс антигенов для АНЦА и усиление апоптоза. Более того, наличие протеиназы-3 на мембране существенно снижает активность фагоцитоза макрофагами по типу сигнала «not-eat-me», что замедляет клиренс апоптотических нейтрофилов. В итоге, усиливается как воспаление, так и аутоиммунный ответ [3].

Антинейтрофильные цитоплазматические антитела напрямую связываются с клетками эндотелия. Повреждение сосудистой стенки может наступать вследствие активации комплемента или антитело-зависимой клеточной цитотоксичности.

Еще одно патологическое действие АНЦА заключается в их мешающем действии по отношению к естественному ингибированию активных ферментов нейтрофилов, в результате чего происходит длительное персистирование в кровотоке антигенов и комплексов антиген-антитело [16].

Система комплемента участвует в патогенезе АНЦА-СВ через альтернативный путь активации. Экспериментальные данные показывают, что праймированные нейтрофилы, активированные АНЦА, генерируют С5а, активизирующие, в свою очередь, рецепторы на мембране нейтрофилов, что дополнительно праймирует нейтрофилы, замыкая порочный круг. Показано повышение уровня С3а, С5а, растворимого С5b-9 и Вb в плазме крови у пациентов с активными васкулитами по сравнению с ремиссией [17].

Суммируя вышесказанное, патогенез АНЦА-СВ кратко можно свести к следующим стадиям [7]: суперантигены и пептидогликаны *Staphylococcus aureus* стимулируют антиген-презентирующие клетки в респираторном тракте, которые продуцируют ИЛ-23, тот, в свою очередь, стимулирует образование Th17 и продукцию ИЛ-17. ИЛ-17 способствует высвобождению провоспалительного цитокина ИЛ-1 β и ФНО- α из макрофагов, которые праймируют нейтрофилы (мембранная экспрессия протеиназы-3) и вызывают повышенную экспрессию молекул адгезии на поверхности как нейтрофилов, так и эндотелия. ИЛ-17 также индуцирует продукцию хемокинов в бронхиальных эпителиальных клетках. Протеиназа-3 нейтрофилов презентуется антиген-презентирующими клетками (В-лимфоциты) Т-лимфоцитам. Т-регуляторные клетки не справляются с ингибированием аутоиммунного ответа, и В-лимфоциты дифференцируются в АНЦА-продуцирующие плазматические клетки. АНЦА индуцируют высвобождение BAFF из активированных нейтрофилов. BAFF и ИЛ-21 стимулируют дифференцировку аутореактивных плазматических клеток. Дефицит или дисфункция регуляторных В-клеток приводит в итоге к нарушенному ингибированию продукции аутореактивных В- и Т-клеток. АНЦА активируют нейтрофилы, которые прикрепляются к эндотелиальным клеткам и продуцируют АФК и протеолитические ферменты, повреждающие сосудистую стенку.

Подводя итог, можно сказать, что есть много данных, устанавливающих роль клеток иммунной системы и продуцируемых ими цитокинов, хемокинов, медиаторов в патогенезе АНЦА-СВ. Утверждается и патологическая роль избыточной продукции свободных радикалов (окислительный стресс), однако нет прямых данных оценки окислительного статуса пациентов при АНЦА-СВ. В приведенной выше схеме АФК упоминаются лишь как повреждающий фактор, в то время как известно, что роль свободных радикалов не ограничивается лишь прямым повреждением молекул. активные формы кислорода играют непосредственную роль в регуляции через АФК-сигнальные пути, в том числе в жизнедеятельности Т-клеток [18, 19]. Знание окислительного статуса пациентов может предоставить новые мишени для терапевтического воздействия, с одной стороны, и дать новые



показатели для оценки тяжести состояния и эффективности терапии – с другой.

Для оценки окислительного статуса были использованы три показателя – уровень антиоксидантной защиты, уровень продукции свободных радикалов естественными источниками в цельной крови, уровень окисленного альбумина как мишени действия свободных радикалов и показатель глубины системного окислительного стресса.

Сывороточный альбумин, основной белок крови, представляет собой антиоксидант, претерпевающий различные окислительные модификации под действием АФК (супероксиданион-радикала, пероксида водорода, гипохлорита), которые можно оценить по изменению его флуоресценции при 353 нм (флуоресценция триптофана). Значимое повышение доли окисленно-модифицированного альбумина у пациентов с АНЦА-СВ свидетельствует о системном окислительном стрессе, причем при генерализованной форме болезни этот показатель значительно выше, чем при локализованной, т. е. уровень системного окислительного стресса связан с генерализацией процесса. Однако активность процесса, наличие и уровень аутоантител, разные варианты васкулитов не влияют на этот показатель.

В объединенной выборке больных удельная интегральная активность нейтрофилов и антиоксидантная активность характеризуются обратной корреляционной зависимостью средней силы. Чем выше радикал-продуцирующая активность нейтрофилов, тем меньше антиоксидантная активность плазмы. Такая же зависимость имеется для больных как в активной стадии процесса, так и в ремиссии. Кроме того, для больных в активной стадии удельная интегральная активность нейтрофилов связана положительной корреляционной связью средней силы с уровнем СРБ, а для больных в ремиссии — с уровнем BVAS.

Согласно литературным данным, нейтрофилы при АНЦА-СВ праймированы. Данные по спонтанной ХЛ подтверждают это положение. Уровень базальной свободно-радикальной активности нейтрофилов значительно выше у больных по сравнению с группой контроля. Более того, радикал-продуцирующая активность нейтрофилов как пиковая, так и интегральная, оказалась выше в группе АНЦА-СВ, что говорит о более актив-

ном ответе на стимул. Однако коэффициент затухания оказался ниже в группе АНЦА-СВ, что свидетельствует о более быстром истощении стимулированных нейтрофилов на фоне иммуносупрессивной терапии. Эти выводы справедливы вне зависимости от активности процесса, его генерализации и варианта васкулита. Следует заметить, что сравнение между группами внутри пациентов АНЦА-СВ не может считаться надежным из-за малочисленности выборок.

Антиоксидантная активность плазмы крови больных оказалась значимо больше, чем у практически здоровых доноров, и этот факт нельзя объяснить повышенным содержанием мочевой кислоты. Видимо, в плазме крови больных присутствуют компоненты, обладающие антиоксидантным действием. В свете полученных данных, терапия антиоксидантами вряд ли является необходимой. Антиоксидантная активность связана положительной корреляцией средней силы с уровнем сАНЦА и стажем болезни/лечения, для больных в активной стадии — с индексом VDI.

- Окислительный стресс у 40 пациентов с АНЦА-ассоциированными системными васкулитами (ГПА, ЭГПА и МПА) был оценен при помощи трех новых методик: хемилюминесцентный анализ радикал-продуцирующей активности нейтрофилов как источника АФК, флуоресцентный анализ окисленного альбумина как мишени действия АФК и хемилюминесцентный анализ антиоксидантной активности плазмы. Повышение доли окисленного альбумина до 0,48 по сравнению с группой контроля (0,24) свидетельствует о системном окислительном стрессе, глубина которого зависит от генерализации процесса. Нейтрофилы находятся в праймированном состоянии, о чем свидетельствует повышенный уровень базальной продукции АФК и повышенный ответ на стимулы. Однако затухание респираторного взрыва происходит быстрее у нейтрофилов больных АНЦА-СВ, что связано, видимо, с иммуносупрессивной терапией. Антиоксидантная активность плазмы больных превышает антиоксидантную активность в группе контроля, что делает со-



мнительной необходимости терапии антиоксидантами.

В дальнейшем представляет интерес расширить круг используемых методов и группы больных, чтобы провести более надежные сопоставления уровня окислительного стресса при разной активности патологического процес-

са, наличии/отсутствии осложнений, генерализации заболевания, варианта системного васкулита с целью выработки диагностических и прогностических критериев.

Работа выполнена при поддержке средств гранта РФФ № 14-15-00375.

Литература

1. Бекетова Т.В. Гранулематоз с полиангиитом, патогенетически связанный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами: особенности клинического течения // Научно-практическая ревматология. 2012. № 6(50). С. 19-28.
2. Бекетова Т.В. Асимптомное течение поражения легких при гранулематозе с полиангиитом (Вегенера) // Научно-практическая ревматология. 2014. Т. 52. № 1. С. 102-104.
3. Witko-Sarsat V., Daniel S., Noel L.H., Mouthon L. Neutrophils and B lymphocytes in ANCA-associated vasculitis // APMIS. Supplementum. 2009. № 117. P. 27-31.
4. Hao J., Wang C., Yuan J., Chen M., Zhao M.H. A pro-inflammatory role of C5L2 in C5a-primed neutrophils for ANCA-induced activation // PloS one. 2013. V. 8. № 6. P. e66305.
5. Muller Kobold A.C., Kallenberg C.G., Tervaert J.W. Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis // Annals of the rheumatic diseases. 1999. V 58. № 4. P. 237-245.
6. O'Brien E.C., Abdulahad W.H., Rutgers A., Huitema M.G., O'Reilly V.P., Coughlan A.M., Harrington M., Heeringa P., Little M.A., Hickey F.B. Intermediate monocytes in ANCA vasculitis: increased surface expression of ANCA autoantigens and IL-1beta secretion in response to anti-MPO antibodies // Scientific reports. 2015. V. 5. P. 11888.
7. Sanders J.S., Abdulahad W.H., Stegeman C.A., Kallenberg C.G. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis and potential targets for biologic treatment // Nephron. Clin. Pract. 2014. V. 128. № 3-4. P. 216-223.
8. Kallenberg C.G., Heeringa P. Complement system activation in ANCA vasculitis: A translational success story? // Molecular immunology. 2015. V. 68. № 1. P. 53-56.
9. Pendergraft W.F., Nachman P.H. 3rd. Recent pathogenetic advances in ANCA-associated vasculitis // Presse medicale. 2015. V. 44. P. e223-229.
10. Keogan M.T., Esnault V.L., Green A.J., Lockwood C.M., Brown D.L. Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies // Clinical and experimental Immunology. 1992. V. 90. № 2. P. 228-234.
11. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Дёмин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9. № 18. С. 418-425.
12. Созарукова М.М., Полимова А.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Изменения в кинетике хемилюминесценции плазмы как мера системного окислительного стресса в организме человека // Биофизика. 2016. Т. 61. С. 337-344.
13. Созарукова М.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии // Вестник РГМУ. 2016. № 1. С. 61-67.
14. Cartin-Ceba R., Peikert T., Specks U. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis // Current rheumatology reports. 2012. V. 14. № 6. P. 481-493.
15. Jennette J.C., Falk R.J. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease // Nature reviews. Rheumatology. 2014. V. 10. № 8. P. 463-473.
16. Salama A.D. Pathogenesis and treatment of ANCA-associated systemic vasculitis // Journal of the Royal Society of Medicine. 1999. V. 92. № 9. P. 456-461.
17. Charles Jennette J., Xiao H., Hu P. Complement in ANCA-associated vasculitis // Semin Nephrol. 2013. V. 33. №6. P. 557-564.
18. Griffiths H.R. ROS as signalling molecules in T cells - evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis // Redox. Rep. 2005. V. 10. № 6. 273-280.
19. D'Autreaux B., Toledano M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007. V. 8. № 10. P. 813-824.

Поступила 2 ноября 2016 г.