

Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов у пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами

А.Е. Шеримова¹, М.М. Созарукова¹, Т.Н. Краснова^{1,2},
Е.В. Проскурнина¹, П.И. Новиков², Н.А. Мухин^{1,2}

Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

Цель. Изучить нарушения радикал-продуцирующей функции нейтрофилов у пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами.

Материал и методы. У 40 пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами определяли показатели радикал-продуцирующей функции нейтрофилов методом кинетической хемилюминесценции с математической обработкой кривой. Контрольную группу составила 50 практически здоровых доноров.

Результаты. У пациентов с АНЦА-ассоциированным васкулитом выявлено увеличение внеклеточной и снижение внутриклеточной радикал-продуцирующей способности нейтрофилов. Величина показателей свободнорадикального дисбаланса и форма кривых отличались в зависимости от тяжести и течения заболевания.

Заключение. У пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами наблюдаются нарушения радикал-продуцирующей функции нейтрофилов, которые могут иметь значение для прогнозирования течения заболевания.

Ключевые слова. АНЦА-ассоциированный васкулит, нейтрофилы, радикал-продуцирующая функция.

Клин. фармакол. тер., 2017, 26 (5), 37-40.

В группу системных васкулитов, ассоциированных с антителами к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА), входят гранулематоз с полиангиитом (Вегенера; ГПА), микроскопический полиангиит (МПА), эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ЭГПА) [1,2]. АНЦА-ассоциированные системные васкулиты характеризуются тяжелым течением, неблагоприятным прогнозом и высокой смертностью. В последнее время в структуре смертности, наряду с агрессивным течением васкулита, отмечается тенденция к увеличению доли инфекционных осложнений [3].

Главная мишень аутоиммунного ответа при АНЦА-ассоциированных васкулитах – нейтрофилы, в результате чего страдает их радикал-продуцирующая функция [4,5]. Одним из надежных методов ее оценки является хемилюминесценция, активированная различными стимулами. Ранее был предложен метод, предполагающий двухэтапную стимуляцию фагоцитов крови и оценку различных параметров радикал-продуцирующей функ-

ции, в том числе интенсивности спонтанного ответа, праймированного ответа, стимулированного ответа, коэффициентов активации и затухания [6]. Альтернативой этому методу может служить кинетическая хемилюминесценция с математической обработкой кривой, позволяющей объективизировать анализ полученных данных и выявить новые параметры, описывающие этот сложный процесс.

Целью исследования было изучение нарушений радикал-продуцирующей функции нейтрофилов у пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами.

Материалы и методы

В проспективное исследование включали пациентов с АНЦА-ассоциированным васкулитом, соответствовавшим критериям Американской коллегии ревматологов и рекомендациям конференции в Чепел-Хилле (2012). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Группу сравнения составили 50 практически здоровых доноров.

АНЦА к протеиназе-3 (ПР-3) и миелопероксидазе (МПО) определяли методом иммуноферментного анализа (верхняя граница нормы – 5 МЕ/мл). Активность васкулита оценивали с использованием индекса активности BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score, version 3.0), тяжесть необратимого поражения органов – с помощью индекса VDI (Vasculitis Damage Index).

Оценку функциональной активности нейтрофильного звена лейкоцитов проводили методом хемилюминесценции с двойной последовательной стимуляцией. Этот подход основан на регистрации динамики свечения нейтрофилов, последовательно стимулированных двумя веществами с разным механизмом действия [7]. На первом этапе нейтрофилы стимулировали форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) с внутриклеточным механизмом действия, на втором этапе проводили стимуляцию формил-метионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ), который обладает внеклеточным механизмом действия. Двойная стимуляция приводит к максимально полному ответу нейтрофилов и, следовательно, к улучшению чувствительности и точности получаемых результатов (рис. 1). Определяли удельную базальную активность нейтрофила, коэффициент затухания (A2/A1) и величину ответа на стимул по площади за 30 минут после добавления фМЛФ. Полученные данные сравнивали с контролем [8].

С целью уточнения способности нейтрофилов к внутри- и внеклеточной продукции активных форм кислорода (АФК) использовали метод математического моделирова-

Адрес: Москва, 119435, Россолимо, 11/5

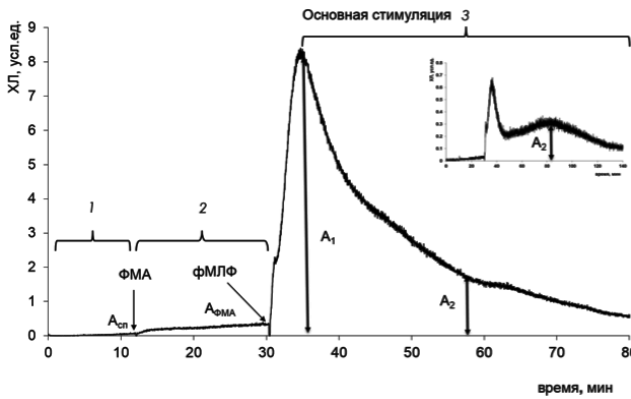


Рис. 1. Типичная кривая развития ХЛ при двойной стимуляции нейтрофилов. (1) — спонтанная ХЛ, (2) — предстимуляция ФМА, (3) — основная стимуляция фМЛФ. Стрелками обозначены точки, когда добавляли стимулирующие вещества

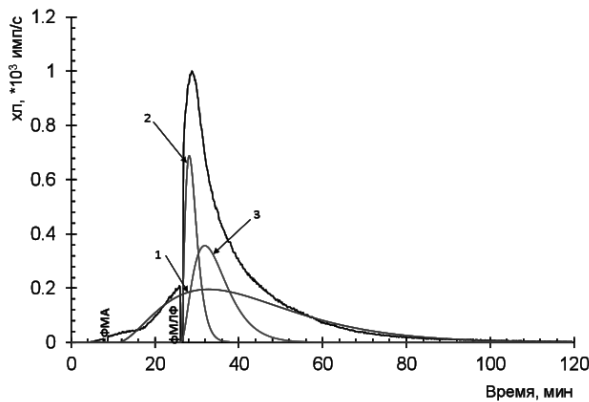


Рис. 2. Кинетическая кривая ХЛ нейтрофилов донора с двухэтапной стимуляцией и результат математической деконволюции на три контура. (1) ФМА-индуцированная продукция АФК, (2) “быстрая” фМЛФ-индуцированная вспышка, (3) “медленная” фМЛФ-индуцированная вспышка

ния кривой кинетической хемилуминесценции с помощью программного модуля на базе платформы LabView (разработчик А.Ю. Рябов), который позволяет разложить итоговый контур на экспоненциально-квадратичные составляющие. Кинетическую кривую раскладывали на три контура (рис. 2):

- ФМА-индуцированная продукция АФК (1),
 - “быстрая” вспышка фМЛФ-индуцированной кривой, возможно, вызванная продукцией АФК цитоплазматической НАДФН-оксидазой (2),
 - “медленная” вспышка, возможно, обусловленная внутриклеточной продукцией АФК (3).
- Для каждой составляющей рассчитывали светосумму за

ТАБЛИЦА 1. Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов у пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами и практически здоровых доноров

Показатель	Доноры	Пациенты с васкулитом	p
Удельная пиковая активность нейтрофила, $\times 10^{-2}$ имп/(схкл)	2,4 (1,7;4,1)	4,9 (2,5;7,0)	0,01
Удельная интегральная активность нейтрофила, имп/кл	2374 (1728;3790)	4148 (3001-6442)	0,001
Коэффициент затухания респираторного взрыва	0,38 (0,32;0,42)	0,30 (0,18;0,46)	0,01
Базальная радикал-продуцирующая активность, $\times 10^{-2}$ имп/(схкл)	0,27 (0,17;0,32)	0,42 (0,22;0,51)	0,006

Примечание: приведены медианы и интерквартильный размах

3000 секунд (S_1, S_2, S_3). Метод наглядно демонстрирует вклад различных источников продукции АФК в нейтрофилах.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета GraphPad Prisma 5.0. 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 применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Коэффициент корреляции считали достоверным при $p < 0,05$. Достоверность различия между группами определяли с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В проспективное исследование были включены 40 больных с АНЦА-ассоциированными системными васкулитами. Среди них было 30 мужчин и 10 женщин в возрасте 18–80 лет. Гранулематоз с полиангиитом (ГПА) диагностировали у 27 пациентов, микроскопический полиангиит (МПА) — у 5, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ЭГПА) — у 4. Все больные наблюдались в Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных заболеваний имени Е.М. Тареева с 2012 по 2015 гг. На момент исследования у 9 больных определялась высокая активность системного васкулита (индекс BVAS 11–21), у 18 — умеренная (индекс BVAS 3–10), у 13 — ремиссия (индекс BVAS 0–2). Тридцать пять больных получали индукционную или поддерживающую иммуносупрессивную терапию, а 5 пациентов были обследованы до начала лечения.

Изменения радикал-продуцирующей способности нейтрофилов не зависели от нозологической формы васкулита (ГПА, МПА, ЭГПА), поэтому ее анализировали во всей выборке пациентов.

У больных с АНЦА-ассоциированными васкулитами по сравнению с контролем было отмечено повышение удельной пиковой активности нейтрофила ($p = 0,01$), удельной интегральной активности нейтрофила ($p = 0,02$), базальной радикал-продуцирующей активности ($p = 0,006$) и достоверное снижение коэффициента затухания респираторного взрыва ($p = 0,01$) (табл. 1).

У пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами деконволюция кинетической кривой привела к вычленению как трех ($n = 10$), так и двух функций ($n = 17$). Пациенты без “медленной” вспышки отличались между собой площадью кривой ФМА-индуцированной продукции АФК. По результатам деконволюции пациенты были условно разделены на 3 группы.

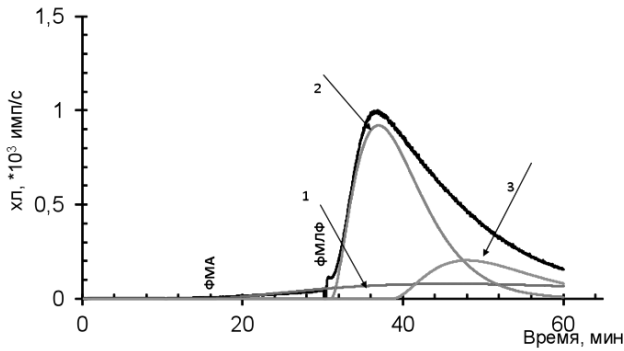


Рис. 3. Кинетическая кривая ХЛ нейтрофилов пациента с двухэтапной стимуляцией и математической деконволюцией, в результате которой были получены три составляющих контура

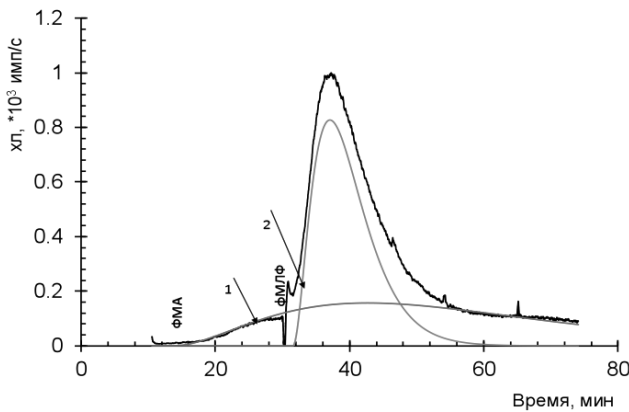


Рис. 4. Кинетическая кривая ХЛ нейтрофилов пациента с двухэтапной стимуляцией и результатом математической деконволюции на три контура. Отсутствует фМЛФ-индуцированная “медленная” вспышка

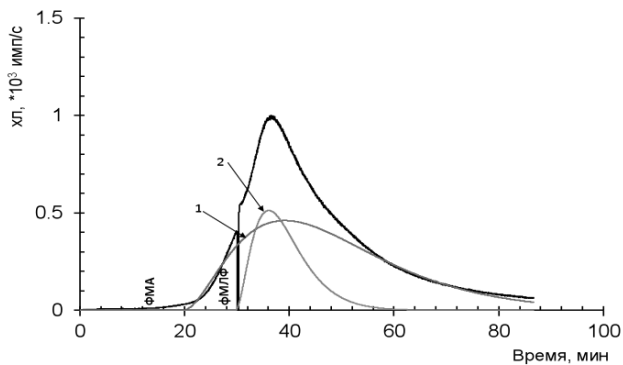


Рис. 5. Кинетическая кривая ХЛ нейтрофилов пациента с двухэтапной стимуляцией и результатом математической деконволюции на три контура. Отсутствует фМЛФ-индуцированная “медленная” вспышка и сильно выражена ФМА-индуцированная продукция АФК.

Первую группу составили 9 пациентов с активным АНЦА-ассоциированным васкулитом с поражением легких (у 6), длительностью болезни до 2 лет и индексом

VDI < 3. У 3 пациентов во время госпитализации наблюдали развитие вторичной инфекции. На кинетической кривой продукции свободных радикалов присутствовали все три составляющие, как и у доноров (рис. 3).

Во вторую группу вошли 7 пациентов с разной степенью активности системного васкулита, поражением не только легких, но и почек (у 3), длительностью болезни от 1 до 6 лет и индексом VDI от 2–4. Вторичная инфекция развилась у 1 больного. На кинетической кривой продукции свободных радикалов отсутствовала “медленная” вспышка при нормальной ФМА-индуцированной вспышке (рис. 4).

Третью группу составили 10 пациентов с умеренной активностью и ремиссией системного васкулита, поражением почек и легких (у 7), длительность болезни 2–23 лет, индексом VDI 4–8. Развитие вторичной инфекции во время госпитализации отметили у 6 пациентов. На кинетической кривой продукции свободных радикалов отсутствовала “медленная” вспышка в сочетании с выраженной ФМА-индуцированной хемилюминисценцией (рис. 5).

Площадь (S_1) ФМА-индуцированного ответа у здоровых доноров была значительно ниже, чем у пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами, а площадь “быстрой” (S_2) и “медленной” (S_3) вспышек фМЛФ-индуцированного ответа – достоверно выше (табл. 2).

У больных 3-й группы площадь (S_1) ФМА-индуцированного ответа достоверно превышала таковую у больных 1-й группы ($p=0,002$) и 2-й группы ($p=0,01$); различия между 1-й и 2-й группами были недостоверными ($p=0,2$). Площадь “быстрой” вспышки (S_2) по фМЛФ-индуцированному ответу у пациентов трех групп не отличалась (табл. 3). При корреляционном анализе выявлена прямая зависимость между площадью (S_1) ФМА-индуцированного ответа и VDI ($r=0,42$; $p<0,05$).

Обсуждение

Одну из ключевых ролей в патогенезе АНЦА-ассоциированных васкулитов играет нарушение радикал-продуцирующей способности нейтрофилов, детальное изучение которой может помочь для оценки течения заболевания. В данной работе был применен новый подход к анализу продукции свободных радикалов нейтрофилами методом кинетической активированной хемилюминисценции с применением математической деконволюции.

Радикал-продуцирующая способность нейтрофилов у больных АНЦА-ассоциированными васкулитами была повышена по сравнению с контролем за счет усиления базальной и стимулированной ФМА и фМЛФ продукции свободных радикалов нейтрофилами. В то же время радикал-продуцирующая функция нейтрофилов при АНЦА-ассоциированных васкулитах является дефицитной, о чем свидетельствует значительное снижение коэффициента затухания стимулированной продукции свободных радикалов и отсутствие внутриклеточной

ТАБЛИЦА 2. Радикал-продуцирующая функция нейтрофилов у пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами и практически здоровых доноров: результат деконволюции

Показатель	Доноры	Пациенты с васкулитом	p
Площадь ФМА-индуцированного ответа (S_1)	135 (133;138)	391 (252;525)	0,0001
Площадь “быстрой” вспышки фМЛФ-индуцированного ответа (S_2)	416 (415;423)	360 (312;417)	0,03
Площадь “медленной” вспышки фМЛФ-индуцированного ответа (S_3)	776 (764;817)	317 (190;378)	0,0001

Примечание: приведены медианы и интерквартильный размах

in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:4115-9.

ТАБЛИЦА 3. Сопоставление различных составляющих радикал-продуцирующей функции нейтрофилов у пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Площадь ФМА-индуцированного ответа (S_1)	271,3±0,42	346,2±0,40	595,5±0,71
Площадь “быстрой” вспышки фМЛФ-индуцированного ответа (S_2)	386±0,39	423,3±0,45	359,5±0,33

Примечание: S_1 у пациентов 3-й группы достоверно выше, чем у пациентов 1-й группы ($p=0,002$) и 2-й группы ($p=0,01$). S_2 у пациентов трех групп достоверно не отличалась

составляющей продукции свободных радикалов нейтрофилами.

Параметры, полученные при деконволюции радикал-продуцирующей кинетической кривой нейтрофилов, могут иметь диагностическое и прогностическое значение. Наличие всех трех кривых, последовательно отражающих окислительный баланс нейтрофилов, возможно, указывает на более благоприятное течение заболевания, в то время как отсутствие кривой, соответствующей “медленной” вспышке, отмечается при поражении легких и почек и ассоциируется с тенденцией к увеличению риска инфекционных осложнений, отсутствие “медленной” вспышки при повышенном ответе на ФМА свидетельствует о нарастании тяжести заболевания, при этом ответ на ФМА коррелирует с тяжестью необратимых поражений (индекс VDI).

Заключение

У пациентов с АНЦА-ассоциированными васкулитами наблюдаются нарушения радикал-продуцирующей функции нейтрофилов, которые могут иметь значение для прогнозирования течения заболевания, однако этот вопрос нуждается в изучении в дополнительных более крупных исследованиях.

1. Моисеев С.В., Новиков П.И., Мешков А.Д., Иваницкий Л.В. АНЦА-ассоциированные васкулиты: спорные вопросы классификации, диагностики и оценки активности и современные подходы к лечению. *Клин фармако тер* 2014;23:44-50.
2. Бекетова Т.В., Насонов Е.Л. Современные представления о классификации и лечении системных васкулитов, ассоциированных с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами: итоги 2011 г. *Терапевтический архив* 2012;5,68-74.
3. Новиков П.И. Клиническая оценка вариантов течения и прогноза гранулематоза с полиангиитом (Вегенера). Дисс. ... канд. мед. наук. М, 2015.
4. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in

5. Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:463-73.
6. Проскурнина Е.В., Шеримова А.Е., Полимова А.М. и др. Новые люминесцентные методы оценки окислительного стресса у больных с системными васкулитами. *Технологии живых систем* 2016;13:26-36.
7. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М. и др. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу. *Российский иммунологический журнал* 2015;9:418-25.
8. Образцов И.В., Годков М.А., Кулабухов В.В., и др. Ранняя диагностика ожогового сепсиса: опыт применения нового хемилюминесцентного метода анализа функциональной активности нейтрофилов с двухстадийной стимуляцией. *Общая реаниматология* 2017;40-51.

Radical-producing function of neutrophils in ANCA-associated vasculitis

A.E. Sherimova, M.M. Sozarukova, T.N. Krasnova, E.V. Proskurnina, P.I. Novikov, N.A. Mukhin

Aim. To evaluate the radical-producing function of neutrophils in patients with ANCA-associated vasculitis.

Material and methods. We studied the parameters of the radical-producing function of neutrophils in 40 patients with ANCA-associated vasculitis by kinematic chemiluminescence with mathematical deconvolution. The control group consisted of 50 healthy donors.

Results. Patients with ANCA-associated vasculitis showed an increase in extracellular and deficient intracellular radical-producing function of neutrophils. The magnitude of free radical imbalance parameters and the shape of the curves differed depending on the severity and course of the disease.

Conclusion. Changes in neutrophil function may have prognostic value in patients with ANCA-associated vasculitis.

Keywords. ANCA-associated vasculitis, neutrophils, radical-producing function.

Clin. Pharmacol. Ther., 2017, 26 (5), 37-40.