

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**ENDOTELINO-1 KONCENTRACIJOS RYŠYS SU UŽDEGIMINIAIS
ŽYMENIMIS ANCA TEIGIAMiems PACIENTAMS**

Magistrantė RŪTA RUTKŪNAITĖ _____

(parašas)

Darbo vadovė
doc. dr. Loreta Bagdonaitė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
doc. dr. Dovilė Karčiauskaitė

leidžiama ginti _____

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2019 m., Vilnius

TURINYS

| | |
|--|----|
| SANTRUMPOS..... | 3 |
| ĮVADAS | 4 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA..... | 5 |
| 1.1. Endotelinas | 5 |
| 1.1.1. Endotelino sintezė..... | 5 |
| 1.1.2. Endotelino receptoriai..... | 6 |
| 1.1.3. ET-1 ir endotelio pažeidimas..... | 6 |
| 1.1.4. Su ET-1 siejamos ligos | 8 |
| 1.2. ANCA – smulkiųjų kraujagyslių vaskulitų žymuo | 9 |
| 1.2.1. Vaskulitų klasifikacija, su ANCA susijusios ligos | 9 |
| 1.2.2. ANCA susidarymo hipotezės..... | 11 |
| 1.2.3. ANCA patogenezė | 15 |
| 1.3. ET-1, ANCA ir uždegiminių žymenų sąsaja..... | 18 |
| 2. TYRIMO METODIKA IR APIMTIS | 20 |
| 2.1. Tiriamieji..... | 20 |
| 2.2. Tyrimo metodai..... | 21 |
| 2.2.1 ANCA tyrimas | 21 |
| 2.2.2 Endotelino tyrimas | 22 |
| 2.3. Statistinė analizė..... | 23 |
| 3. REZULTATAI..... | 24 |
| 3.1. ET-1 ryšys su lytimi ir amžiumi..... | 24 |
| 3.2. ET-1, ANCA fluorescencinio švytėjimo tipo ir klinikinės būklės sąsaja | 26 |
| 3.3. ET-1 ryšys su uždegiminiais žymenimis..... | 28 |
| 4. REZULTATŲ APTARIMAS..... | 31 |
| IŠVADOS | 35 |
| SANTRAUKA..... | 37 |
| SUMMARY..... | 38 |
| LITERATŪROS ŠALTINIAI | 39 |

SANTRUMPOS

- AAV** – su ANCA susiję vaskulitai
- ANCA** – antikūnai prieš neutrofilų citoplazmos antigenus
- BVAS** – Birmingemo vaskulitų aktyvumo skalė naudojama įvertinti vaskulitų aktyvumą
- c-ANCA** – citoplazminio tipo ANCA fluorescencinis švytėjimas
- CCL5** – chemokinas CCL5
- CRB** – C reaktyvusis baltymas
- ECE-1, ECE-2** – 1 arba 2 tipo endoteliną konvertuojantis baltymas
- ENG** – eritrocitų nusėdimo greitis
- ET-1, ET-2, ET-3** – 1, 2 arba 3 tipo endotelinas
- ET_A** – endotelino A receptoriai
- ET_B** – endotelino B receptoriai
- GM-CSF** – granulocitų–makrofagų kolonijas stimuliuojantis veiksnys
- ICAM-1** – 1 tipo tarpląstelinė adhezijos molekulė
- IgA** – imunoglobulinai A
- IgG** – imunoglobulinai G
- IL** – interleukino baltymas
- INF- γ** – interferonas γ
- IQR** – tarpkvartilinis plotis
- JARSŽ** – jungiamojo audinio, raumenų, skeleto ir žarnyno ligos
- MCP-1** – 1 tipo monocitų chemoatraktantinis baltymas
- MPO** – mieloperoksidazė
- MPO-ANCA** – ANCA prieš mieloperoksidazę
- NET** – neutrofilų ekstraląstelinis tinklas
- p-ANCA** – perinuklearinio tipo ANCA fluorescencinis švytėjimas
- PECAM-1** – 1 tipo trombocitų/endotelio ląstelių adhezijos molekulė
- PR3** – proteinazė-3
- PR3-ANCA** – ANCA prieš proteinazę-3
- ROS** – reaktyvūs deguonies radikalai
- TGF- β** – transformuojantis augimo faktorius β
- TNF- α** – navikų nekrozės faktorius α
- VCAM-1** – 1 tipo kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė
- VEGF** – kraujagyslių endotelio augimo faktorius

ĮVADAS

Autoimuninės ligos – tai būklės kuomet organizmo imuninė sistema pradeda kovoti prieš savo pačios organizmo organus, audinius, ląsteles taip dažnai sukeldamos sisteminius pažeidimus. Autoimuninių ligų grupei priskiriama mažiausiai 80 skirtingų būklių. Vienos iš jų – su antikūnais prieš neutrofilų citoplazmos antigenus (ANCA) susiję vaskulitai (kraujagyslių uždegimai) [1].

Lietuvos Higienos instituto duomenimis, 2018 metais užregistruoti 158 nauji su ANCA susijusių vaskulitų atvejai, iš jų 88 sirgo granulomatoze su poliangitu, 30 – mikroskopiniu poliangitu, o 40 – eozinofiline granulomatoze su poliangitu [2]. ANCA autoantikūnai dažniausiai sukelia smulkiųjų kraujagyslių vaskulitus, taip pažeisdami tokius gyvybiškai svarbius organus kaip plaučiai ir inkstai, kuriuose yra platus kapiliarų tinklas, todėl ankstyva diagnostika yra ypač svarbi šių ligų atvejais [3,4].

Entotelinas-1 (ET-1) – tai iš 21 aminorūgšties sudarytas baltymas, kurį daugiausiai sintetina endotelis ir kuris moksliniuose tyrimuose dažnai naudojamas kaip kraujagyslių pažeidimo žymuo [5–7]. Padidėjusi jo sintezė buvo nustatyta ne tik sergant hipertenzija ar ateroskleroze, bet ir vaskulitų atvejais, todėl kyla klausimas, kokį vaidmenį ET-1 galėtų atlikti ANCA patogenezėje ir ar tai tarpusavyje susiję elementai [8–12]. Jei ET-1 yra jautrus kraujagyslių endotelio pažeidimui, galbūt jis galėtų būti taikomas ANCA teigiamų pacientų būklių įvertinimui? Grindžiant literatūros šaltiniuose pateikta informacija, buvo iškelta šio tyrimo **hipotezė**: ET-1 ir ANCA yra susiję patogenetiškai – ANCA inicijuotas endotelio pažeidimas prisideda prie padidėjusio ET-1 išsiskyrimo.

Tyrimo **tikslas**: įvertinti endotelino ir ANCA patogenezės sąsają tiriant ET-1 koncentraciją ANCA teigiamiems asmenims ir vertinant ET-1 ryšį su uždegiminiais žymenimis.

Tikslui įgyvendinti buvo išsikelti šie **uždaviniai**:

1. Nustatyti ET-1 koncentraciją ANCA teigiamiems pacientams ir įvertinti ją atsižvelgiant į pacientų amžių ir lytį;
2. Įvertinti ET-1 koncentracijos pokyčius, susijusius su ANCA fluorescencinio švytėjimo tipu ir ligų grupėmis;
3. Įvertinti ET-1 ryšį su uždegiminiais žymenimis (neutrofilų skaičiumi, CRB ir ENG) ANCA teigiamiems pacientams.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Endotelinas

1.1.1. Endotelino sintezė

Japonų mokslininkas M. Yanagisawa su kolegomis 1987 metais išgrynino baltymą, sudarytą iš 21 aminorūgšties, kuris sukelia kraujagyslių (arterijų ir venų) susiaurėjimą, ir pavadino jį endotelinu [5]. Dabar yra žinomos trys endotelino izoformos – ET-1, ET-2 (nuo ET-1 skiriasi dvejomis aminorūgštimis) ir ET-3 (nuo ET-1 skiriasi penkiomis aminorūgštimis) [13,14]. ET-1 yra anksčiausiai atrasta ir labiausiai mokslininkų tyrinėjama endotelino forma, kadangi tai kartu yra ir labiausiai žmogaus organizme paplitusi endotelino izoforma. Audiniuose ET-1 pasižymi autokrininiu ir parakrininiu poveikiu [15,16]. Pagrindinis ET-1 funkcija yra skatinti vazokonstrikcija, kuri kartais gali tęstis net 1 valandą ar ilgiau, todėl jis yra itin svarbus veiksnys reguliuojant kraujo spaudimą organizme [14,16]. Įdomu tai, jog atlikus tyrimus paaiškėjo, jog ET-1 struktūra labai panaši į sarafotoksinų, kurie randami gyvačių nuoduose ir kurie turi kardiotoksinį poveikį bei sukelia lygiųjų raumenų susitraukimus [17]. Tai parodo, jog ET-1 gali turėti tiek naudingą, tiek žalingą poveikį organizmui [18].

Nors *in vivo* pagrindinis ET-1 gamintojas yra endotelis, tačiau jį taip pat sintetina bei sekretuoja ir kitos ląstelės: fibroblastai [8,16], lygiųjų raumenų ląstelės [18,19], kardiomiocitai [20], astroцитai [21], neuronai [8,19], hepatocitai [22], keratinocitai [23], kvėpavimo takų epitelio ląstelės [8], makrofagai [24,25], inkstų šerdies ląstelės, putliosios ląstelės, Kupferio ląstelės ir kai kurie leukocitai [19]. Tuo tarpu ET-2 (arba ET-2 iRNR) buvo aptiktas žarnyno epitelinėse ląstelėse, kiaušidėse, hipofizėje, širdyje, plaučiuose, kraujagyslėse, o ET-3 – smegenyse, antinksčiuose inkstų kanalėlių, ir žarnyno epitelio ląstelėse [8,14]. Tai leidžia įtarti, jog endotelinai atlieka svarbų vaidmenį žmogaus organizme ne tik normalioje būsenoje, bet ir esant organizmo pažeidimams.

Visos endotelino formos sintetina vienu keliu. Ląstelė, gavusi signalą iš aplinkos, aktyvina reikiamų genų transkripciją. Nutranskribuota prepro-endotelino iRNR keliauja į citoplazmą, kur vyksta baltymo sintezė. Susintetintą 212 aminorūgščių prepro-endoteliną veikia fermentas furinas, kuris atskelia dalį aminorūgščių nuo C ir N baltymo galų, kol lieka 38 aminorūgštys vadinamos pro-endotelinu arba „didžiuoju endotelinu“. Didįjį endoteliną-1 toliau skaldo endoteliną konvertuojantys baltymai – ECE-1 ir ECE-2, didįjį endoteliną-2 – ECE-1, o didįjį endoteliną-3 ECE-1 arba eritrocitų paviršiuje esantys Kell glikoproteinai. Galiausiai susidaro 21 aminorūgšties ilgio baltymas – endotelinas [14,16].

ET-1 gamybą ir sekreciją skatina įvairūs cheminiai ir fiziniai veiksniai, pavyzdžiui, TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-6, trombinas, insulinas, noradrenalinas, adrenalinas, angiotenzinas II,

vazopresinas, bradikininas, mažo tankio lipoproteinai, reaktyvūs deguonies radikalai (ROS), endotoksinas, kardiotropinas-1, homocisteinas, hipoksija, nedidelė šlyties įtampa ar hipokapnija [8,15,16,19,26,27]. Tuo tarpu stipri šlyties įtampa, heparinas, prostaglandinas gali blokuoti ET-1 sekreciją. Azoto oksidas, prostaciklinas bei prieširdžių natriurezinis peptidas gali veikti dvejopai ir vienais atvejais skatinti ET-1 gamybą, o kitais – slopinti [19].

1.1.2. Endotelino receptoriai

Endotelino molekulės organizme jungiasi prie dviejų tipų receptorių – ET_A ir ET_B. Endotelino receptoriai yra septynis kartus ląstelės membraną perveriantys baltymai, susiję su G baltymais, kurie tarpininkauja perduodant sugeneruotą signalą į ląstelės vidų. ET-1 ir ET-2 yra giminingesni ET_A receptoriui lyginant su ET-3, tuo tarpu visos trys endotelino izoformos turi vienodą giminingumo laipsnį ET_B receptoriui. Abeji receptoriai yra aptinkami įvairiuose audiniuose ir tai sufleruoja apie galimai esančią multifunkcinę endotelinų sistemą [13,16].

ET_A receptoriai daugiausia išsidėsto kraujagyslių lygiuosiuose raumenyse ir yra atsakingi už kraujagyslių susitraukimą, ląstelių proliferaciją ir uždegimą skatinančią funkciją [19]. ET-1 prisijungęs prie ET_A receptorių padidina Ca²⁺ jonų koncentraciją ląstelės viduje ir sukelia kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių susitraukimą [8,15,19].

ET_A receptorius galima aptikti ir kitose ląstelėse: adipocituose [28,29], kardiomiocituose [30], hepatocituose [22,31], kepenų žvaigždinėse ląstelėse [22], keratinocituose [23], makrofaguose [25], inkstų glomerulų kapiliaruose, inkstų šerdyje išsidėsčiusiuose surenkamuosiuose kanalėliuose, neuronuose, nerve klajoklyje ir melanocituose [19].

Kalbant apie ET_B receptorius, yra išskirti du jų tipai - ET_{B1} receptoriai yra ekspresuojami ant endotelio ląstelių ir dalyvauja nuo NO priklausomoje vazodilatacijoje bei prostaciklinų gamyboje, o ET_{B2} receptoriai ekspresuojami kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelėse ir jų dirginimas sukelia vazokonstrikciją [15,19]. ET_A ir ET_B santykis lygiųjų raumenų ląstelėse priklausomai nuo kraujagyslės rūšies gali skirtis: nustatyta, kad venose ET_A:ET_B santykis yra mažesnis nei arterijose (t. y. ET_A arterijose yra sąlyginai daugiau nei venose) [8].

Nors daugiausia ET_B receptorių galima aptikti ant endotelio ląstelių, tačiau jie ekspresuojami ir kitose ląstelėse: neuronuose ir neuroglijoje (astrocituose) [21], kardiomiocituose [28,30], adipocituose [29], Kupferio ląstelėse, kepenų žvaigždinėse ląstelėse ir hepatocituose [22], inkstų kanalėlių epitelio ląstelėse [19].

1.1.3. ET-1 ir endotelio pažeidimas

Endotelis - tai specializuotas vienasluoksnis plokščiasis epitelis, išklojantis kraujagyslių vidų ir dalyvaujantis daugybėje svarbių biologinių funkcijų [16,18]. Endotelis

palengvina kraujo cirkuliaciją, slopina perdėtą kraujo plokštelių agregaciją ir leukocitų adheziją, užkerta kelią lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijai, reguliuoja kraujagyslių tonusą kontroliuodamas vazokonstrikcinius (pvz. ET-1) ir vazodilatacinius junginius (pvz. azoto oksidas, prostaglandinai) bei slopina ekstraląstelinio matrikso depoziciją. Tinkamas endotelio funkcionavimas yra kritiškai svarbus augant ir atkuriant pažeistus audinius [16].

Tam tikri veiksniai gali pažeisti endotelio ląsteles ir jas aktyvuoti, o tai gali būti įvairių ligų pradžia. Tokie veiksniai gali būti: bakterinė ar virusinė infekcija, oksidacinis stresas sukeltas reaktyvių deguonies radikalų, hipoksija, turbulentinis kraujo tekėjimas, šlyties įtampa bei aplinkos dirgikliai (tabakas, hiperlipidemija). Vis dėlto ne visada aišku, kas konkrečiai sukelia pradinį endotelio ląstelių pažeidimą [16,32].

Į pažeidimą reaguodamas endotelis, be įvairių molekulių aktyvavimo, prisideda ir prie ET-1 koncentracijų pokyčių. Visa tai sukelia kraujagyslių struktūros ir formos pokyčius [16]. Nors įprastai ET-1 yra įvardijamas kaip lygiųjų raumenų spazmogenas, tačiau jis dalyvauja ir daugybėje uždegiminių procesų. ET-1 ekspresija stebima ir sveikų žmonių organizme, tačiau ji kur kas labiau padidėja gavus signalus iš tam tikrų citokinų, reaktyvių deguonies radikalų, angiotenzino II ar trombino, kurie signalizuoja apie endotelio pažeidimą [15]. ET-1 veikdamas per ET_A ir ET_B receptorius skatina ekstraląstelinio matrikso gamybą, o aktyvindamas NF-κB baltymų kompleksą, veikiantį genų transkripciją, skatina adhezijos molekulių ICAM-1, VCAM-1 ir E-selektinų ekspresiją endotelio ar fibroblastų paviršiuje. Prie šių adhezijos molekulių prisijungia kraujyje cirkuliuojantys leukocitai, o tai palengvina jų infiltraciją į kraujagyslės sienelę [8,15,19,33,34].

Priartėję prie kraujagyslių sienelių aktyvuoti leukocitai išskiria įvairias medžiagas, tarp kurių ir medžiagos, žalojančios endotelį bei aplink esančius audinius (pavyzdžiui, ROS) ir skatinančios uždegimą (pavyzdžiui, TNF-α, IL-1, IL-6). Tuo pačiu, tie patys citokinai dar labiau skatina ET-1 gamybą, o ET-1 padidina TNF-α sintezę makrofaguose ir monocituose. TNF-α padidina uždegiminį atsaką pritraukdamas daugiau makrofagų, monocitų ir neutrofilų į pažeidimo vietą [19]. ET-1 stimuliuoja monocitus, jog šie išskirtų IL-8 ir MCP-1, kurie yra neutrofilų ir monocitų chemoatraktantai. ET-1 taip pat gali veikti ir kaip putliųjų ląstelių aktyvatorius, kuris sukelia degranuliaciją ir uždegiminių citokinų sekreciją (TNF-α, IL-6) [15]. Be jau minėtų citokinų, ET-1 skatina ir IL-13, IL-2, CCL5 ir GM-CSF, TGF-β gamybą [16,35]. Taigi, ET-1 gali būti laikomas uždegimą skatinančiu baltymu, kuris prisideda prie leukocitų aktyvavimo, o šių išskiriamos medžiagos prie stipresnio endotelio pažeidimo ir dar didesnės ET-1 koncentracijos.

ET-1 reikšmę kraujagyslių uždegimo vystymesi parodė D. W. Anggrahini su kolegomis, kurie atliko bandymą su pelėmis. Jie išvedė pelių liniją, kurių endotelis nesintetino ET-1 ir lygino kraujagyslių histologiją tarp mutavusių pelių grupės ir kontrolinės grupės po kraujagyslės pažeidimo. Mokslininkų grupė nustatė, jog mutavusių pelių kraujagyslės uždegimas

ir neointimos formavimasis buvo gerokai mažesnis nei kontrolinės grupės – aptikta mažiau endotelio adhezijos molekulių (VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1), mažiau proliferavusių kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių ir tarpląstelinio užpildo sankaupų, mažesnės leukocitų sankaupos kraujagyslės sienelėje bei sumažėjusi endotelino receptorių ET_A ir ET_B iRNR raiška [7].

1.1.4. Su ET-1 siejamos ligos

Fiziologinėmis sąlygomis ET-1 koncentracija yra labai maža, todėl sutrikus ET-1 sekrecijai ar receptorių ekspresijai yra stebimos įvairios ligos [13]. Endotelino receptorių (ET_B) svarbą įrodo faktas, jog net vieno nukleotido pakeitimas (G→T) gali lemti tam tikras ligas, pavyzdžiui, Hiršprungo ligą [36]. Literatūros duomenimis padidėjusi ET-1 koncentracija yra siejama su išsėtine skleroze, Alzheimerio liga, patyrus insultą ar smegenų traumą [21], sergant kepenų ligomis [31], atopiniu dermatitu, astma [23], virusine ir bakterine pneumonija, Čago liga, bakteriniu meningitu [15] esant sepsiui [19], sergant plaučių arterine hipertenzija, plaučių emfizema, lėtiniu širdies nepakankamumu, lėtiniu inkstų nepakankamumu [13,35,37,38], sisteminė skleroze [16]. Padidėjusi ET-1 koncentracija siejama ir su cukriniu diabetu, nes mažina ląstelių jautrumą insulinui [29].

Yra žinoma, jog ET-1 skatina ROS gamybą ir sukelia oksidacinį stresą. Papildomai suleidus ET-1 į veną ir taip padidinus jo koncentraciją kraujyje, pirmiausia stebimas kraujagyslių atsipalaidavimas, po kurio seka stiprus, ilgai trunkantis kraujagyslių susitraukimas, kuris sukelia išemiją, o ši veda į ROS gamybą [19]. Li ir kolegų atlikti tyrimai su žiurkėmis pademonstravo, jog sergant hipertenzija ET-1, aktyvuodamas ET_A receptoriaus/NAPDH oksidazės signalinį kelią, padidina superoksido (O_2^-) koncentraciją ir VCAM-1 ekspresiją arterijose [12]. Sukeltas oksidacinis stresas siejamas su padidėjusia aterosklerozės rizika, nes padidėja lipidų peroksidacija, sumažėja didelio tankio lipoproteinų koncentracija, skatinama monocitų ir makrofagų infiltracija [39]. Svarbų ET-1 ir jo receptorių vaidmenį aterosklerozėje kitų ligų vystymesi patvirtina atlikti tyrimai su ET_A receptorių antagonistais (pavyzdžiui, BQ123), kurių naudojimas stabdo aterosklerozės vystymąsi [8] ir sisteminį uždegimą, nes mažina TNF- α ir IL-1 β gamybą [38]. Be to, F. Bellisai ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, jog kitas ET receptorių antagonistas - bosentanas statistiškai reikšmingai sumažino citokinių IL-2, IL-6, IL-8 ir INF- γ koncentracijas sisteminė skleroze sergantiems žmonėms [37].

Ne tik padidėjusi ET-1 koncentracija yra patologijas sukeliantis veiksnys, bet ir jo trūkumas tam tikrais vystymosi etapais. Mokslininkas Y. Kurihara su kolegomis atliko tyrimą su pelėmis, kurio metu sutrikdė ET-1 geno ekspresiją, to pasekoje homozigotinės pelės ($ET-1^{-/-}$) gimė su veido srities kaukolės išsigimimais ir greitai po gimimo mirė nuo kvėpavimo sistemos

sutrikimų, o heterozigotinės pelės (ET-1^{+/-}) gamino mažesnius kiekius ET-1 ir turėjo padidėjusį kraujo spaudimą. Eksperimento rezultatai leido daryti prielaidą, jog ET-1 yra būtinas normaliam pelių vystymuisi ir svarbus užtikrinant širdies ir kraujagyslių homeostazę [40].

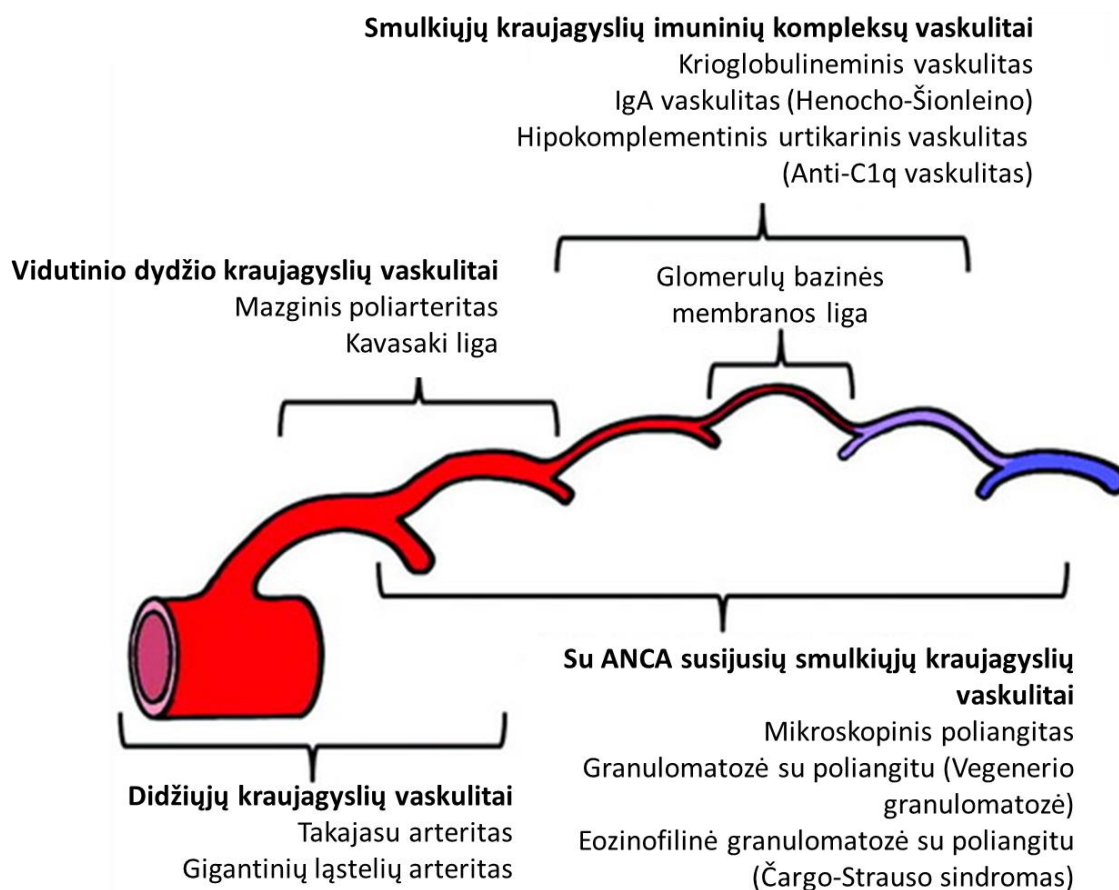
1.2. ANCA – smulkiųjų kraujagyslių vaskulitų žymuo

1.2.1. Vaskulitų klasifikacija, su ANCA susijusios ligos

Jungtinėse Amerikos Valstijose, Šiaurės Karolinoje esančiame miestelyje Chapel Hill 2012 metais vyko antroji tarptautinė konsensuso konferencija, į kurią susirinko mokslininkų ir gydytojų bendruomenė. Pagrindinis susibūrimo tikslas buvo patikslinti 1994 metais vykusios pirmosios konsensuso konferencijos metu sudarytą vaskulitų nomenklatūrą – pavadinimus ir apibrėžimus bei peržiūrėti ir atnaujinti vaskulitų klasifikaciją [4].

Vaskulitas – tai kraujagyslės sienelės uždegimas [4,41]. Apibrėžiant plačiai, vaskulitai gali būti infekciniai, sukelti tiesioginės patogenų invazijos ir proliferacijos kraujagyslių sienelėse, ir neinfekciniai. Vis dėlto kai kurie neinfekciniai vaskulitai gali būti netiesiogiai susiję su infekcijomis. Minėtoje konferencijoje buvo klasifikuojami neinfekciniai vaskulitai. Pagrindinis vaskulitų klasifikacijos rodiklis buvo dažniausiai pažeidžiamos kraujagyslės, tai yra, vaskulitai buvo suskirstyti į didžiųjų, vidutinių ir mažųjų kraujagyslių (1 pav.). Vis dėlto beveik visi vaskulitai gali pažeisti bet kurio dydžio kraujagysles, tad toks vaskulitų skirstymas yra tik orientacinis [4].

Didžiųjų kraujagyslių, tokių kaip aorta ir jos atšakos, vaskulitams yra priskiriami Takajasu ir gigantinių ląstelių arteritai. Vidutinių kraujagyslių (pagrindinių visceralinių arterijų ir jų atšakų) vaskulitams priskiriami mazginis poliarteritas ir Kavasaki liga. Smulkiųjų kraujagyslių (arteriolės, venulės, kapiliarai) vaskulitai yra išskirti į dvi grupes – su ANCA susiję vaskulitai ir imuninių kompleksų vaskulitai (anti-glomerulo bazinės membranos liga, krioglobulineminis vaskulitas, IgA vaskulitas, hipokomplementinis urtikarinis vaskulitas). Be to, išskiriami įvairių kraujagyslių vaskulitai, kurie vienodai dažnai gali pažeisti įvairių dydžių kraujagysles – Behceto liga (*angl. Behcet's disease*) ir Kogano sindromas (*angl. Cogan's syndrome*) bei vieno organo vaskulitai – tai vaskulitai, pažeidžiantys įvairias kraujagysles viename organe, pavyzdžiui, odos leukocitoklastinis angitas, odos arteritas ir kiti [4].



1 pav. Vaskulitų klasifikacija pagal pažeistų kraujagyslių dydį [4].

Su ANCA susiję vaskulitai (AAV) – tai grupė sunkių, sisteminių autoimuninių ligų su nekrozuojančiu vaskulitu, pirmiausiai linkusių pažeisti smulkias kraujagysles ir susijusių su antikūnais prieš neutrofilų mieloperoksidazę (MPO) ar proteinazę-3 (PR3) [4,42,43]. AAV nebūdingos imuninių kompleksų nuosėdos kraujagyslių sienelėse arba būdingas nedidelis jų kiekis, tuo tarpu kitiems smulkiųjų kraujagyslių vaskulitams būdingas žymus imuninių kompleksų nusėdimas ant kraujagyslių sienelių [4,44].

AAV priskiriami: mikroskopinis poliangitas, granulomatozė su poliangitu (arba Vegenerio granulomatozė), eozinofilinė granulomatozė su poliangitu (arba Čargo-Strauso sindromas). AAV klinikinė išraiška gali būti įvairi ir varijuoti nuo odos bėrimų iki sunkių ir staigių daugiafunkcinių pažeidimų. Mikroskopiniam poliangitui būdingas nekrozuojantis glomerulonefritas. Taip pat dažnai pasireiškia ir plaučių kapiliaritas. Granulomatozė su poliangitu dažniausiai pažeidžia viršutinius ir apatinius kvėpavimo takus. Taip pat dažnai pasireiškia nekrozuojantis glomerulonefritas ir akies kraujagyslių pažeidimai su hemoragijomis. Eozinofilinei granulomatozei su poliangitu būdingas gausus eozinofilais, nekrozuojantis uždegimas, kuris dažnai pažeidžia kvėpavimo sistemą ir gali būti siejamas su astma. Dažni nosies polipai, gali pasitaikyti ir glomerulonefritas [4,45]. AAV diagnostika yra sudėtinga, diagnozei patvirtinti

dažnai reikalinga biopsija, kadangi simptomai nėra specifiniai ir gali reikšti daugybę kitų ligų. Maždaug trečdaliui pacientų AAV diagnozuojami daugiau nei po 6 mėnesių, kai liga jau būna pažengusi ir sisteminė [45]. Tikslus AAV diagnozės nustatymas be laboratorinių imunologinių tyrimų yra neišvengiamas. Jų metu yra tiriami pacientų serume esantys autoantikūnai prieš PR3 ar MPO. ANCA tiriant imunofluorescencijos metodu, citoplazminis granulių fluorescencinis švytėjimas (c-ANCA) siejamas su detektuotais antikūnais prieš PR3, o perinuklearinis fluorescencinis švytėjimas (p-ANCA) su antikūnais prieš MPO. C-ANCA dažniau aptinkami sergant granulomatoze su poliangu ir rečiau – sergant eozinofiline granulomatoze su poliangu. Tuo tarpu p-ANCA dažniau aptinkami pacientams sergantiems inkstų vaskulitu ir rečiau – pacientams sergantiems granulomatoze su poliangu. Vis dėlto svarbu atkreipti dėmesį, jog ANCA gali būti aptinkami ne tik pacientams sergantiems AAV, bet sergantiems ir kitomis jungiamojo audinio, raumenų bei skeleto ligomis (mazginiu poliarteritu, gigantinių ląstelių arteritu ar greitai progresuojančiu glomerulonefritu, raudonąja vilklige, polimiozitu, sausuoju (Sjogreno) sindromu, reumatoidiniu artritu, Felčio sindromu, psoriaziniu artritu, Stilio liga, ankiloziniu spondilitu ar reaktyviuoju artritu) ar žarnyno ligomis (opiniu kolitu ar Krono liga), tačiau dalyje tokių atvejų ANCA būna specifiški ne PR3 ar MPO, o kitiems antigenams – katalazei, α -enolazei, laktoferinui ar baktericidiniams pralaidumą didinantiems baltymams [42,46].

Nors sergamumas AAV skirtingose populiacijose yra panašus – maždaug 11-47 atvejų milijonui gyventojų per metus, tačiau vaskulitų tipai populiacijose skiriasi. Pavyzdžiui, Vegenerio granulomatoze dažniau sergama Norvegijoje, Jungtinėje Karalystėje, Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje, tuo tarpu mikroskopiniu poliangu daugiau sergama Ispanijoje, Kuveite, Kinijoje ir Japonijoje. Tai leidžia iškelti hipotezę, jog arčiau polių esančios populiacijos yra linkusios dažniau sirgti Vegenerio granulomatoze, o arčiau pusiaujo esančios populiacijos – mikroskopiniu poliangu, tačiau iki šiol ši hipotezė nebuvo patvirtinta [42,47]. Europoje naujų su ANCA susijusių vaskulitų atvejų per metus nustatoma nuo 13 iki 20 vienam milijonui gyventojų [48]. Tuo tarpu paskaičiuota, jog bendras sergamumas AAV siekia maždaug 46-184 žmones milijonui gyventojų [45].

1.2.2. ANCA susidarymo hipotezės

ANCA – tai antikūnai prieš neutrofilų ir monocitų citoplazmoje esančius antigenus. ANCA antikūnai gali priklausyti tiek IgG, IgM ar IgA klasėms, bet aktyvioje ligos fazėje dominuoja IgG. Antikūnai gali susiformuoti prieš bet kurį neutrofilų ar monocitų baltymą, bet kliniškai reikšmingi antikūnai susidaro prieš mieloperoksidazę ir 29 kDa serino proteinazę-3, kurios yra neutrofilų azurofilinėse granulėse [41,42].

Iki šiol nėra visiškai aišku, kaip susidaro ANCA, tačiau siūlomos kelios hipotezės. Pagrindiniai antigenai PR3 ir MPO yra apsaugoti nuo imuninės sistemos, nes laikomi neutrofilų citoplazmos granulėse, o po degranuliacijos yra greitai pašalinami uždegimo vietoje veikiančių inhibitorių: α 1-antitripsino (neutralizuoja PR3) ir ceruplazmino (neutralizuoja MPO). Šie mechanizmai apsaugo nuo minėtų antigenų pateikimo imuninei sistemai ir autoantikūnų susidarymo. Vis dėlto įvairūs veiksniai gali padidinti imuninės sistemos jautrumą ir autoantikūnų susidarymą [42,49].

Apoptozė arba programuota ląstelės mirtis yra itin svarbi kontroliuojant ankstyvo uždegiminio atsako trukmę ir tokiu būdu apribojant neutrofilų audiniams daromą žalą. Apoptozės metu ląstelės membrana patiria pokyčius – joje pradamos eksponuoti fosfatidilserino molekulės, kurias atpažįsta makrofagai ir pašalina apoptotines ląsteles neuždegiminiu būdu, tai yra, išskirdami citokinus, pavyzdžiui, TGF- β [50]. Manoma, jog ANCA gali susidaryti sutrikus neutrofilų apoptozei, kai sutrinka apoptotinių ląstelės fragmentų pašalinimas ir dendritinės ar kitos antigeną pateikiančios ląstelės pateikia neutrofilų viduje buvusius baltymus T ląstelėms ir taip iššaukia imuninį atsaką. Taigi, sutrikęs ar prailgėjęs apoptotinių dalelių pašalinimas gali inicijuoti ANCA gamybą ir skatinti sisteminių vaskulitų vystymąsi [42]. Tai įrodo Y. C. Patry ir kolegų atliktas tyrimas, kur pilkosioms žiurkėms (*angl. Brown Norway rats*) sušvirkštus apoptotinių neutrofilų užfiksuotas ANCA susidarymas, o sušvirkštus šviežiai izoliuotų neutrofilų ANCA nesusidarė [51].

Neutrofilų lemtis yra žūti apoptozės arba nekrozės būdu atlikus savo funkciją, tačiau 2004 metais buvo atrasta trečioji ląstelių mirties rūšis, tai yra, netozė. Šio proceso metu formuojamas neutrofilų ekstraląstelinis tinklas (NET), kuriame neutrofilai įkalina ir nužudo ekstraląstelinius patogenus taip padarydami kuo mažesnę žalą audinio ląstelėms. Susidarę NET yra pašalinami makrofaagų. NET gali turėti žalingą poveikį organizmui, kadangi jis susidaro iš į ekstraląstelinę ertmę išstumto chromatino ir granulėse esančių baltymų (tarp jų ir MPO ir PR3), o tai gali iššaukti autoimuninių ligų vystymąsi. Be to, išskirtas NET žaloja endotelį ir gali iššaukti alternatyvaus komplemento sistemos kelio aktyvaciją bei skatinti trombino gamybą, o tai padidina trombų susidarymo riziką [42,52]. NET susidarymą gali inicijuoti ne vienas veiksnys: tarp jų ROS, įvairūs mikroorganizmai (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Yersinia sp.*, *Porphyromonas gingivalis*), ar jau susidarę ANCA [52–54].

Kita ANCA susidarymo hipotezė yra susijusi su genais, kurie kontroliuoja imuninio atsako stiprumą. Išsiaiškinta, jog 3 pagrindiniai ANCA asocijuoti vaskulitai yra susiję su skirtingais ŽLA variantais: mikroskopinis poliangitas su ŽLA-DQ, eozofilinė granulomatozė su poliangitu su ŽLA-DRB4, o granulomatozė su poliangitu su ŽLA-DP1 ir genu SERPINA1.

SERPINA1 genas koduoja α 1-antitripsiną – pagrindinį PR3 inhibitorių. Sumažėjęs α 1-antitripsino aktyvumas gali lemti užsitęsusių PR3 buvimą uždegimo apimtame audinyje ir ANCA susiformavimą [42,49]. Vis dėlto P. A. Lyons ir kolegų atliktame tyrime, kuriame buvo tirti su ANCA susijusiais vaskulitais sirgę pacientai iš Jungtinės Karalystės (1233 asmenys) bei šiaurės Europos (1454 asmenys), buvo nustatyta, jog genetiniai skirtumai turėtų būti siejami ne su ANCA susijusiomis ligomis, bet su ANCA tipu. Mokslininkų komanda išsiaiškino, jog ŽLA haplotipų ir SERPINA1 geno mutacijos, siejamos su granulomatoze su poliangitu, pasireiškia turint c-ANCA fenotipą, bet ne p-ANCA. Šių genų mutacijos taip pat siejamos ir su c-ANCA fenotipą turinčiais ir mikroskopiniu poliangitu sergančiais pacientais. Dar daugiau, mokslininkai teigia, jog pats PR3 antigenas, siejamas su c-ANCA, gali turėti skirtingas genetines variacijas ir kad tai gali lemti skirtingą su ANCA susijusių vaskulitų patogenezę [55]. Serologinio ANCA tipo svarbą iškėlė ir britų mokslininkas R. A. Watts, kuris teigė, jog AAV geriau apibūdina ANCA tipai (MPO-ANCA/PR3-ANCA), o ne klinikiniai simptomai, ir kad AAV gydymas taip pat turėtų būti paskirtas atsižvelgiant į tai [56]. P. Jarrot ir G. Kaplanski savo 2016 metų straipsnyje teigė, jog neutrofilų membranos antigenų ekspresija yra valdoma genetiškai ir jog buvo pastebėta, kad pacientų, sergančių AAV, PR3 ir MPO genų raiška buvo sutrikusi dėl epigenetinių modifikacijų, todėl neutrofilų membranose buvo padidėjusi šių molekulių ekspresija, o tai gali iššaukti autoantikūnų formavimąsi [43]. J. J. Yang ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, jog pacientų, sergančių su ANCA susijusiu glomerulonefritu, tam tikrų genų, susijusių su neutrofilų granuliu baltymais, transkripcija yra suintensyvėjusi – tarp jų ir MPO ir PR3 genų transkripcija (transkriptų buvo 4,7-11,2 kartų daugiau nei kontrolinėje grupėje). Įprastu atveju šie genai yra nutildomi tada, kai subrendę neutrofilai palieka kaulų čiulpus. Taigi, tokie rezultatai iškelia hipotezę, jog patologinis komponentas, kuris aktyvina nutildytus genus yra ne mažiau svarbus nei susidarantys autoantikūnai ir gali būti reikšmingas veiksnys esant staigiai ir sunkiai ligos pradžiai [57].

Be to, ANCA susidarymas gali būti siejamas ir su patogeno *Staphylococcus aureus* ar Ross River virusu. Šie sukėlėjai inicijuoja autoimuninį atsaką dėl molekulinės mimikrijos, tai yra, jų antigenai primena tam tikrus žmogaus organizmo antigenus, o šiuo atveju PR3, MPO ar kitus ANCA epitopus [42,58].

Patogeniniai mikroorganizmai autoimuninį atsaką gali iššaukti ir kitu būdu. Transmembraniniai atpažinimo receptoriai (TLR) – tai grupė svarbių įgimtą imuniniam atsakui receptorių, esančių leukocitų membranose ir sugebančių atpažinti patogenus. Visų pirma, mikrobu išskirti produktai stimuliuoja makrofagų TLR ir makrofagai išskiria uždegiminiuosius citokinus, kurie skatina neutrofilus išlaisvinti PR3 (serino proteazė, kuri prisideda prie mikroorganizmų išskiriamų baltymų nukenksminimo), o endotelio ląsteles ekspresuoti adhezijos molekules, kurios į pažeidimo vietą pritrauktų dar daugiau uždegiminių ląstelių. Šios ląstelės, atsakydamos į TLR

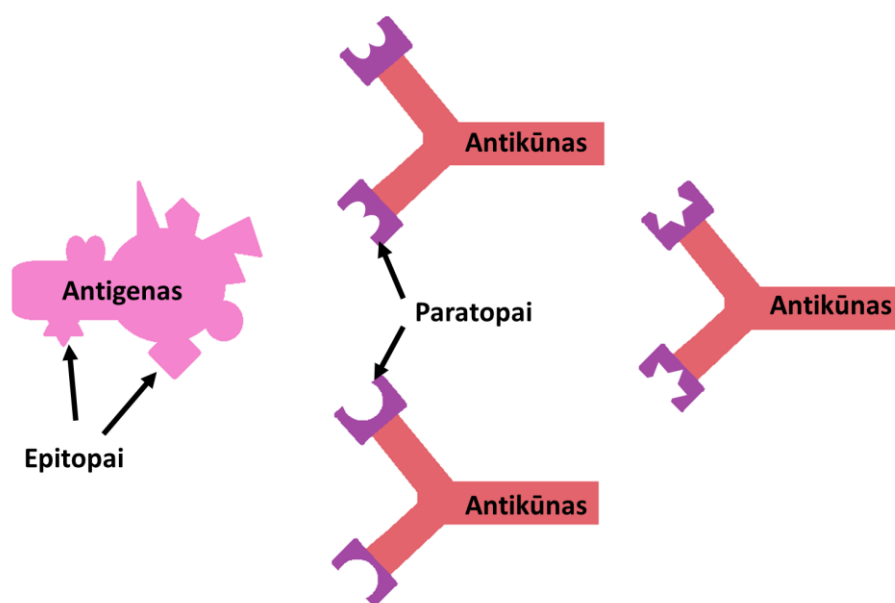
dirginimą gamina dar daugiau uždegiminių citokinių, tarp jų ir IL-23, kuris skatina T ląsteles diferencijuotis į Th17 fenotipą. Th17 ląstelės yra atskira CD4+ T ląstelių atšaka, kuri išsiskiria tuo, jog gamina citokiną IL-17, kuris skatina kitų uždegiminių citokinių (TNF- α , IL-6, IL-8) išskyrimą, padidėjusią adhezijos ir ŽLA molekulių ekspresiją bei monocitų ir neutrofilų telkimą. Th17 ląstelės yra pagrindinės ląstelės vystantis autoimunitetui. Jos yra aktyvios uždegiminės ląstelės, kurios ne tik inicijuoja ir palaiko audinių uždegimą įdarbindamos kitas uždegimines ląsteles, bet ir generuoja aplinką, kuri suteikia atsparumą ląstelėms T-reguliacinių ląstelių kontrolei [42,59]. Slopinamos T-reguliacinės ląstelės nebegali slopinti antigeną pateikiančių ląstelių kostimuliuojančių molekulių CD80 ir CD86 ekspresijos, kuri reikalinga T efektorinių ląstelių sužadanimui. Slopinant T-reguliacinių ląstelių veiklą, nebeslopinama autoreaktyvių T ląstelių proliferacija ir nutraukiama uždegimą slopinančių citokinių gamyba [60]. Pastovi antigeną pateikiančių ląstelių IL-23 gamyba, manoma, yra esminis Th17 ląstelių palaikymo uždegimo vietoje faktorius, o E. Nogueira ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, jog padidėjęs Th17 kiekis gali būti siejamas su PR3-ANCA teigiamais pacientais ar granulomatoze su paliangitu sergančių pacientų remisija [42,61]. B. Wilde ir kolegų atliktas tyrimas parodė, jog sergant AAV sumažėja B-reguliacinių ląstelių, o tai gali paveikti T reguliacines ląsteles, kurios slopina Th17 ląstelių aktyvumą ir autoimunitetinį atsaką [62].

Manoma, jog aplinkos faktoriai taip pat gali turėti įtakos su ANCA susijusių vaskulitų vystymuisi. J. A. Gomez-Puerta ir kolegų atlikta metaanalizė parodė, jog ANCA vystymuisi įtakos gali turėti kristalinio silicio oksido poveikis. Yra siūlomi du šios sąveikos paaiškinimai: pirma, silicio oksidas gali sukelti ląstelių nekrozę ar apoptozę, o esant šioms būsenoms pirminės granulės atsiduria neutrofilų paviršiuje arba jų išorėje ir tai gali iššaukti autoantikūnų formavimąsi; antra, po kontakto su silicio oksidu individų alveolėse gali užsilikti jo dalelių, o silicio oksidas yra žinomas kaip stiprus T ląstelių adjuvantas, kuris esant genetinei predispozicijai, gali sukelti nekontroliuojamą sisteminių uždegimą, kuris gali tapti AAV vystymosi pradžia [63]. Be to, pastebėta, jog silicio oksidas gali inaktyvuoti α 1-antitripsiną, kuris, kaip jau prieš tai minėta, yra PR3 slopiklis ir taip iššaukti autoimuninį atsaką [47].

Kitas aplinkos veiksnys, galimai galintis iššaukti ANCA gamybą, yra ilgalaikis kokaino ar tam tikrų medikamentų vartojimas: antibiotikų (minociklino, cefotaksimo, nitrofurantoino, rifampicino), anti-TNF- α priemonių, psichoaktyvių medžiagų ir kai kurių kitų vaistų, pavyzdžiui, propiltiouracilo, metimazolo, karbimazolo ar benziltiouracilo (kurie skirti skydliaukės sutrikimams gydyti), hidralazino, levamizolo, D-penicilamino, alopurinolio, fenitoino ir sulfasalazino [43,47,64,65].

1.2.3. ANCA patogenezė

ANCA patogeniškumas vis dar kelia klausimų, kadangi pasitaiko pacientų, kurie turi pastovų c-ANCA/p-ANCA titrą, tačiau nesusiduria su jokiais klinikiniais vaskulitų simptomais [43,44,47] arba todėl, kad ANCA titrai ne visada atspindi ligos aktyvumą ar atkryčius [42]. Vienas iš paaiškinimų slypi autoantigeno epitopuose [44] (2 pav.). A. J. Roth ir kolegų tyrimas atskleidė, jog MPO turi 25 epitopus prie kurių gali prisijungti ANCA ir kad asmenų, sergančių su ANCA susijusiomis ligomis, MPO-ANCA IgG gali prisijungti prie kitų ir didesnio skaičiaus epitopų nei sveikų asmenų [66]. Taip pat pastebėta, kad sveikų žmonių organizmuose ANCA titrai yra žymiai mažesni nei sergančių [44].



2 pav. Antigenas ir antikūnai. Vienos rūšies antigenas gali turėti ne vieną epitopą, kuriuos atpažįsta skirtingi antikūnai.

Sergant su ANCA susijusiomis ligomis esminį vaidmenį patogenezėje atlieka neutrofilai. Jie yra svarbi mūsų įgimto imuniteto sudedamoji dalis. Neutrofilai gaminami kaulų čiulpuose esančių kamieninių ląstelių. Įprastai neutrofilai turi iš 2-5 segmentų sudarytą branduolį ir trijų tipų granules: pirmines (azurofilines), antrines (specifines) ir tretines. Pirminės granules sudaro antibakterinės medžiagos – mieloperoksidazė (katalizuoja chlorido peroksidaciją į hipochloritą), defensinas, lizocimas, neutralios serino proteazės (elastazė, proteinazė 3, katepsinas G), rūgštinės hidrolazės (katepsinas B ir D, fosfolipazė A2). Neutrofiluose antrinių granulių yra daugiausia ir jos susideda iš komplemento aktyvatorių ir kitų fermentų (pvz. kolagenazė, lakterinas, lizocimas, fosfolipazė A2). Tretinės granules sudaro neutralios proteazės (pvz. gelatinazė, plazmingeno aktyvatorius) ir rūgštinės hidrolazės (jau minėti katepsinas B ir D) [42,67]. Viena pagrindinių neutrofilų funkcijų – neutralizuoti į organizmą patekusius mikroorganizmus. Jie gali būti naikinami keliais būdais: juos fagocituojant, išskiriant NET ar

proteolizinius fermentus iš granulių ir gaminant ROS. Vis dėlto neutrofilai pasižymi ribotu aktyvumu įprastoje būsenoje ir tam, kad jų fagocitozinis aktyvumas pasiektų maksimumą, reikia tam tikro signalo [42,68]. Neutrofilus aktyvinti gali uždegiminiai citokinai: TNF- α , IL-1, IL-18 ar komplemento komponentas C5a. Aktyvinimo metu neutrofilų membranoje pradedami ekspresuoti granulėse esantys baltymai. [42,69]. Nedidelis kiekis MPO ir PR3 antigenų gali būti ekspresuojami neutrofilų membranoje ir neaktyvioje būsenoje, tačiau juos aktyvius antigenų kiekis membranoje smarkiai padidėja [69].

Taigi, dėl ankstesniame skyriuje išvardintų priežasčių susidarę ANCA prisijungia prie neutrofilų paviršiuje rečiau ar tankiau ekspresuojamų MPO ar PR3 baltymų ir aktyvina neutrofilus. Neutrofilų aktyvacija vyksta ANCA IgG kontaktuojant su ląstelių membranose esančiais Fc receptoriais ir IgG Fab'2 daliai prisijungiant prie ANCA antigenų [69]. Aktyvuoti neutrofilai išskiria alternatyvųjį komplemento kelią aktyvuojančias medžiagas – properdiną, proteazes, deguonies radikalus. Aktyvuotas alternatyvus komplemento sistemos kelias generuoja membranas atakuojantį kompleksą ir C5a, kuris yra stiprus neutrofilų chemoatraktantas. Šio kelio aktyvavimas į uždegimo vietą pritraukia dar daugiau neutrofilų [58]. Komplemento sistemos svarbą ANCA patogenezėje parodo eksperimentai su anti-MPO IgG turinčiomis pelėmis, kuomet slopinant C3 arba C5 komplemento baltymus buvo išvengta glomerulų nekrozės bei padidėjusios neutrofilų ir monocitų koncentracijos arba D. R. W. Jayne ir kolegų atliktas tyrimas kuomet naudojant C5a receptoriaus slopiklį *Avacopan* apie 75% procentų pacientų Birmingemo vaskulitų aktyvumo skalės (BVAS) indeksas po 24 savaičių sumažėjo bent perpus [70–72].

Aktyvuoti neutrofilai į aplinką sekretuoja įvairius citokinus ir chemokinus, kurie veikia įvairias imunines ląsteles, tarp jų ir monocitus, dendritines ląsteles, T ir B limfocitus [42]. Aplinkoje susidarę TNF- α , INF- γ , IL-1 ar IL-4 aktyvina endotelio ląsteles ir jų paviršiuje suintensyvėja adhezijos molekulių ICAM-1 ir VCAM-1 ekspresija [73]. Šios adhezijos molekulės sąveikauja su neutrofilų paviršiuje esančiais β 2-integriniais. Neutrofilai priartėja prie kraujagyslių endotelio ląstelių ir dėka sąveikos su adhezijos molekulėmis priglunda prie jo. Tai būtinas elementas vykstant įgimtam imuniniam atsakui. Po adhezijos, prasideda neutrofilų migracija pro endotelį į kraujagyslės sienelę ir gretimus audinius. Yra išskirti du migracijos pro endotelį būdai: tarpląstelinis, kuriuo naudojasi dauguma neutrofilų, ir ląstelinis, kai neutrofilai pereina endotelio ląsteles per juose esančias poras [42,74,75]. Įprastai neutrofilai patekę į audinius fagocituotų ar kitais būdais bandytų neutralizuoti į organizmą patekusį patogeną, tačiau ANCA aktyvuoti neutrofilai priartėję prie endotelio ląstelių degranuliuojasi ir į aplinką paleidžia ROS ir lizuojančius fermentus. Šios medžiagos pažeidžia endotelio ląsteles ir iššaukia jų nekrozę ar apoptozę [42,43,69,70]. Priartėjus neutrofilams membranoje esantys MPO ir PR3 tiesiogiai jungiasi prie endotelio ląstelių ir sukelia citoskeleto pokyčius, dėl to padidėja kraujagyslių pralaidumas, arba

inicijuojama endotelio ląstelių apoptozė [43]. Be to, dalis prie endotelio ląstelių priartėjusių neutrofilų išleidžia NET, kuris ne tik į aplinką paskleidžia dar daugiau ANCA epitopų, tačiau ir tiesiogiai žeidžia endotelio ląsteles [42,43]. Taigi, ANCA aktyvuotų neutrofilų adhezija prie endotelio ląstelių sukelia negrįžtamus kraujagyslių sienelių pokyčius.

Pradinis kraujagyslių sienelių pažeidimas gali sukelti kraujavimą ir plazmos baltymų aktyvinimą, įskaitant ir krešėjimo faktorius. Dėl to formuojasi fibrinas ir inicijuojama fibrinoidinė nekrozė. Bėgant laikui, neutrofilus uždegimo vietoje keičia marofagai ir prasideda audinio randėjimo fazė, tuomet uždegimo vietoje nusėda kolagenas. Tolimesnė kraujagyslės struktūra ir funkcija priklauso nuo uždegimo stiprumo ir randėjimo intensyvumo. Jei kraujagyslė pažeidžiama nedaug, po tam tikro laiko jos struktūra ir funkcija gali sugrįžti į pradinę būseną, tuo tarpu sunkus pažeidimas gali sukelti visišką kraujagyslės nepraeinamumą [42,76].

Susidarę ir kraujyje cirkuliuojantys ANCA tiesiogiai veikia ne tik neutrofilus, bet ir monocitus [69]. Aktyvuoti monocitai išskiria uždegimą skatinančius citokinus MCP-1 (dar žinomas kaip CCL2), IL-1 β , IL-6, TNF- α ir IL-8, kuris pritraukia ir aktyvuoja neutrofilus ir taip gali padidinti neutrofilų sukeltą pažeidimą. MCP-1 pritraukia monocitus ir makrofagus ir gali būti siejamas su neutrofilų pakeitimu į monocitus ir makrofagus uždegimo vietoje. Aktyvuoti monocitai, taip pat kaip ir neutrofilai, gali išskirti ROS ir padidinti tam tikrų molekulių ekspresiją membranoje: CD63 (degranuliacijos žymuo), CD64 (Fc γ receptorius), integrinų (CD29, CD18, CD11a,b), kurie padidina leukocitų adheziją prie endotelio. Monocitai gali išskirti ir tirpius junginius, pavyzdžiui, MCP1 α ir VEGF, kurie gali aktyvinti endotelį. Taigi, panašiai kaip ir neutrofilai monocitai gali dalyvauti kraujagyslių pažeidimuose [44,77].

Tiriant su ANCA susijusias ligas buvo pastebėti ne tik nekrozuojantys bet ir granulominiai uždegimai. Vieni tyrėjai teigia, jog granulomos išsivysto dėl T ląstelių kontroliuojamo imuninio atsako (IV hiperjautrumo reakcijos), tuo tarpu kiti, jog granulomatozė yra įgimtas uždegiminis atsakas į ūminį ekstravaskulinį uždegimą, kurį inicijuoja ANCA sukelta neutrofilų aktyvacija. Pastaroji hipotezė aiškinama taip: neutrofilai aktyvuojami už kraujagyslių ribų, pavyzdžiui, plaučių alveolių pogleivyje, sudirginti neutrofilai membranų paviršiuje padidina MPO ir PR3 ekspresiją, prie šių baltymų prisijungia ANCA, ANCA aktyvina neutrofilus, kurie aktyvina alternatyvųjį komplemento sistemos kelią, inicijuojamas mikroabsceso formavimasis (dėl susikaupusios ląstelių nekrotinės masės), kuris savo ruožtu sukelia granulominę reakciją už kraujagyslių sienelės ribų [44,65]. Pacientams sergantiems granulomatoze su poliangitu ir eozinofiline granulomatoze su poliangitu būdingi ekstravaskuliniai granulominiai uždegiminiai mazgai, kuriuose gausu makrofagų ir daugiabranduolių gigantinių ląstelių. Pradinėje stadijoje pažeidimo centre gausu įvairių nekrozės ir apoptozės stadijų neutrofilų, o pakraščiuose – plonas makrofagų sluoksnis. Vėlesnėje pažeidimo stadijoje centre matoma amorfinė nekrotinė masė,

kurią juosia epitelioidiniai makrofagai. Dar vėlesnėje stadijoje, centre esančias nekrotines nuosėdas pakeičia randėjantis audinys ir limfocitai [42,65].

Atliktų tyrimų su gyvūnais duomenimis vien ANCA susidarymo pakanka sukelti ūmiai ligai, o aktyvus neutrofilų ir kitų leukocitų dalyvavimas dar labiau sustiprina besivystančios ligos simptomus. Genetinė predispozicija lemia imuninės sistemos jautrumą ir ligos sunkumo laipsnį, cirkuliuojantys uždegimą skatinantys citokinai pasunkina ligą, o alternatyvaus komplemento sistemos kelio aktyvinimas reikalingas kraujagyslių uždegimui sukelti [44].

Kai kurie atlikti tyrimai kelia hipotezę, jog ANCA ir organizme esantis uždegimas veikia sinergiškai ir sukelia sunkesnes ANCA ligų formas. Vienas iš tokių tyrimų yra H. Xiao ir kolegų atliktas tyrimas, kuriame buvo stebimos pelės užkrėstos gripo A/WSN/33 virusu, kurios po vienos dienos gavo anti-MPO IgG injekcijas, bei pelių grupė, kuri buvo užkrėsta tik minėtu virusu, bet negavo imunoglobulinų injekcijos bei trečioji grupė, kuri gavo tik anti-MPO IgG injekciją. Visoms pelėms, kurios gavo anti-MPO injekcijas išsivystė pūsmėnulinis glomerulonefritas, o pelių grupei, kuri prieš tai buvo apkrėsta virusu dar išsivystė ir alveolinis kapiliaritas. Šis tyrimas parodo, jog organizme jau esant virusinei infekcijai ANCA sukeltas pažeidimas būna sunkesnės formos [69].

1.3. ET-1, ANCA ir uždegiminių žymenų sąsaja

Kaip jau minėta anksčiau, ET-1 gali veikti ne tik kaip vazokonstriktorius, bet ir kaip uždegimą skatinantis baltymas. Endotelio pažeidimas, sąlygotas bakterijų, virusų, ROS, hipoksijos, netolygaus kraujo tekėjimo ar aplinkos veiksnių, pavyzdžiui, rūkymo, lemia padidėjusią ET-1 sintezę, o ET-1 skatina monocitus išskirti neutrofilų ir monocitų chemoatraktantus (IL-8, MCP-1), skatina ekstraląstelinio matriksą gamybą, adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1, E-selektinų) ekspresiją. Adhezijos molekulės palengvina kraujyje cirkuliuojančių leukocitų prilipimą prie kraujagyslių ir jų patekimą į periferinius audinius, o tai gali lemti stipresnį uždegiminį atsaką [15,16,32].

Sergant su ANCA susijusiomis ligomis, esminį vaidmenį patogenezėje atlieka neutrofilai, kadangi prieš jų granulėse esančius antigenus susidaro antikūnai. Autoantikūnams prisijungus prie neutrofilų šie aktyvinami (arba degranuliuojasi) – išskiriami įvairūs citokinai, ROS, alternatyvųjį komplemento kelią aktyvinančios medžiagos, proteoliziniai fermentai ar NET. Minėti antikūnai taip pat aktyvina ir monocitus – stimuliuoja uždegimą skatinančių molekulių (TNF- α , IL-1 β , IL-6) gamybą, kitų leukocitų chemoatraktantus ir didina leukocitų adhezijos molekulių ekspresiją ląstelių membranose. Aplinkoje susitelkusios TNF- α ir kitos molekulės veikia endotelį ir skatina adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1) ekspresiją endotelio ląstelių paviršiuje, o priartėję prie kraujagyslių sienelių leukocitai išskiria kraujagyslių sienelės žalojančius

junginius. Žalojamas kraujagyslių endotelis išskiria ET-1, kuris skatina dar didesnę adhezijos molekulių ekspresiją ant endotelio, dar daugiau leukocitų pritraukiamą į pažeidimo vietą ir sukeliama dar stipresnis uždegimas. Visa tai sukelia žalingą procesų ciklą. Vis dėlto ET-1 vaidmuo ANCA patogenezėje nėra iki galo ištirtas, o taip pat nėra iki galo aišku, ar ET-1 kaip nors prisideda prie ANCA susidarymo (pavyzdžiui, galbūt ET-1 galėtų padidinti proteinazės-3 ir mieloperoksidazės ekspresiją neutrofilų membranose ar skatinti neutrofilų degranuliaciją) [15,33,42,43,58,69,70,73].

C reaktyvusis baltymas (CRB) yra ūmios fazės uždegime dalyvaujantis baltymas, kurio pavadinimas kilo nuo gebėjimo kontaktuoti ir precipituoti su *Streptococcus pneumoniae* sienelėje esančiu C grupės polisacharidu esant Ca^{2+} jonams aplinkoje [78]. CRB yra sintetinamas kepenyse kaip atsakas į IL-6 stimuliaciją. CRB koncentracija pradeda didėti praėjus kelioms valandoms nuo infekcijos pradžios ir maksimumą pasiekia po 1-2 dienų. Baltymas prisijungia prie pažeistų, nekrozuojančių ar bakterinių ląstelių, skatina neutrofilus ir makrofagus tokias ląsteles fagocituoti ir aktyvina komplemento sistemą, kuri padeda palaikyti uždegimą. Didėjanti CRB koncentracija aktyvina dar daugiau neutrofilų ir makrofagų bei skatina IL-6, IL-1 β ir TNF- α sekreciją. Būtent dėl to CRB ir laikomas uždegimą skatinančiu baltymu. Vis dėlto CRB turi ir priešuždegiminių savybių – skatina IL-10 ir IL-1 receptoriaus slopiklių sekreciją, telkia komplemento sistemos slopiklius [79,80].

Eritrocitų nusėdimo greitis (ENG) – dar vienas plačiai naudojamas uždegimo žymuo. Jis parodo, kiek milimetrų eritrocitų masės nusėda per tam tikrą laiką (dažniausiai valandą) kraujo plazmoje naudojant natrio citrato antikoaguliantą ir specialų vertikalų vamzdelį. Sergant vaskulitu ENG padidėja, nes padidėja fibrinogeno ir imunoglobulinų koncentracijos kraujyje. Vis dėlto vien ENG rezultatas negali būti naudojamas diagnozei nustatyti, kadangi jo reikšmei įtakos gali turėti ir kiti veiksniai – nėštumas, anemija, aukšta aplinkos temperatūra ar netinkamas kraujo atskiedimas antikoaguliantu – tačiau tiek ENG tiek anksčiau minėtas CRB puikiai tinka sekti ligos eigai ir tam tikrais atvejais įvertinti ligos pažengimo laipsnį. Tai parodo mokslininkų atlikti tyrimai, kuomet padidėjusios CRB ir ENG reikšmės buvo nustatytos sergant įvairiomis vaskulitų formomis (pavyzdžiui, gigantinių ląstelių arteritu, granulomatoze su poliangitu) [81–83].

2. TYRIMO METODIKA IR APIMTIS

2.1. Tiriamieji

Tyrimo dalyvavo 29 pacientai, kuriems 2017 m. rugsėjo – 2018 m. vasario mėnesiais Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose buvo nustatytas teigiamas ANCA tyrimo rezultatas ir iširta ET-1 koncentracija kraujo serume. Analizei naudoti pacientų demografiniai duomenys (amžius, lytis), laboratorinių tyrimų rezultatai (ANCA fluorescencinio švytėjimo tipas, CRB, ENG, neutrofilų skaičius) ir apibendrinta klinikinė būklė (su ANCA susiję vaskulitai arba jungiamojo audinio, raumenų, skeleto ir žarnyno ligos).

Analizuojant duomenis pacientai buvo suskirstyti:

1) į dvi grupes pagal lytį – vyrus ir moteris, remiantis tuo, kad ET-1 koncentracijai įtakos gali turėti lytiniai hormonai [84–86];

2) į dvi grupes pagal amžių – pacientės, kurios ANCA tyrimo atlikimo dieną buvo jaunesnės nei 49 metai bei pacientės, kurios buvo 49 metų amžiaus ir vyresnės. Toks moterų skirstymas buvo pasirinktas todėl, kad, literatūros duomenimis, vidutiniškai tokio amžiaus moterims Lietuvoje prasideda menopauzė [87,88]. Menopauzė yra susijusi su estrogenų koncentracijos pokyčiais, o literatūroje teigiama, jog estrogenai mažina ET-1 koncentraciją [84–86]. Vyrų ET-1 koncentracijos skirtumai skirtingose amžiaus grupėse nebuvo tirti atskirai, dėl mažos imties (6 asmenys) ir dėl to, kad visi tyrimo dalyvavę vyrai buvo vyresnio amžiaus (jauniausias – 48 metų);

3) į dvi grupes pagal ANCA fluorescencinį švytėjimo tipą: c-ANCA ir p-ANCA;

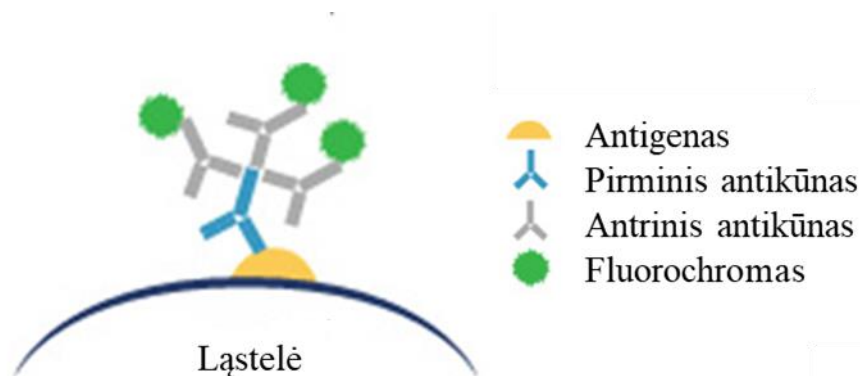
4) į dvi grupes pagal nurodytas klininkines išėtis: pacientai sirgę eozinofiline granulomatoze su poliangitu, mikroskopiniu poliangitu, granulomatoze su poliangitu ar su ANCA susijusiu psmėnulinu glomerulonefritu buvo priskirti prie I grupės (su ANCA susijusių vaskulitų – AAV), tuo tarpu, pacientai, sirgę reumatoidiniu artritu, sistetine raudonąja vilklige, Krono liga, psoriazine artropatija, Felčio sindromu, poliartritu, sausuoju (Sjogreno) sindromu buvo priskirti II grupei (jungiamojo audinio, raumenų, skeleto ir žarnyno ligoms – JARSŽ).

Informacija apie pacientų uždegiminių žymenų (ENG, CRB ir neutrofilų skaičių) vertes buvo surinkta remiantis vidinėje ligoninės informacinėje sistemoje pateiktais duomenimis. Pacientams uždegiminių žymenų tyrimai buvo atlikti kelias dienas prieš arba po ANCA tyrimo atlikimo.

2.2 Tyrimo metodai

2.2.1 ANCA tyrimas

Antikūnams prieš neutrofilų citoplazmos antigenus tirti buvo naudojamas netiesioginės imunofluorescencijos metodas (3 pav.). Tyrimas atliktas naudojant *Immco diagnostics ANCA Kit (ethanol)* rinkinį.



3 pav. Netiesioginės imunofluorescencijos metodo principas [89].

Tyrimui naudoti specialiai paruošti objektiniai stikleliai, ant kurių imobilizuoti žmogaus neutrofilai. Tiriamoji medžiaga – praskiestas kraujo serumas – buvo užlašinama ant paruošto objekcinio stiklelio tikintis, jog serume esant ANCA antikūnams (IgG) jie sureaguos su substrate esančiais antigenais ir sudarys kompleksus. Po inkubacijos drėgnoje kameroje nesureagavę antikūnai buvo nuplaunami ir ant objekcinio stiklelio užlašinamas konjugatas, kurį sudaro antikūnai (IgG) prieš žmogaus ANCA antikūnus su prijungtu fluorochromu (fluoresceino izotiocianatu – FITC). Po inkubacijos konjugatas nuplaunamas. Norint pagerinti būsimo mikroskopuojamo vaizdo kontrastingumą plaunant paskutinį kartą į plovimo buferį galima įlašinti kelis lašus Evano mėlynojo dažo (*angl. Evan`s blue*). Galiausiai objekcinis stiklelis buvo padengiamas glicerinu bei uždengiamas dengiamuoju stikleliu ir mikroskopuojamas fluorescenciniu mikroskopu naudojant atitinkamą filtrą. Mėginyje esant antikūnams prieš proteinazę-3 matomas ryškiai žalias difuzinis citoplazminis fluorescencinis švytėjimas (c-ANCA), o esant antikūnams prieš mieloperoksidazę matomas ryškiai žalias fluorescencinis švytėjimas aplink ląstelių branduolius (p-ANCA) (4 pav.). Norint nustatyti titrus, procedūra kartojama naudojant skirtingo skiedimo kraujo serumus. Mūsų tyrimo atveju buvo naudotas 1:40 titras.



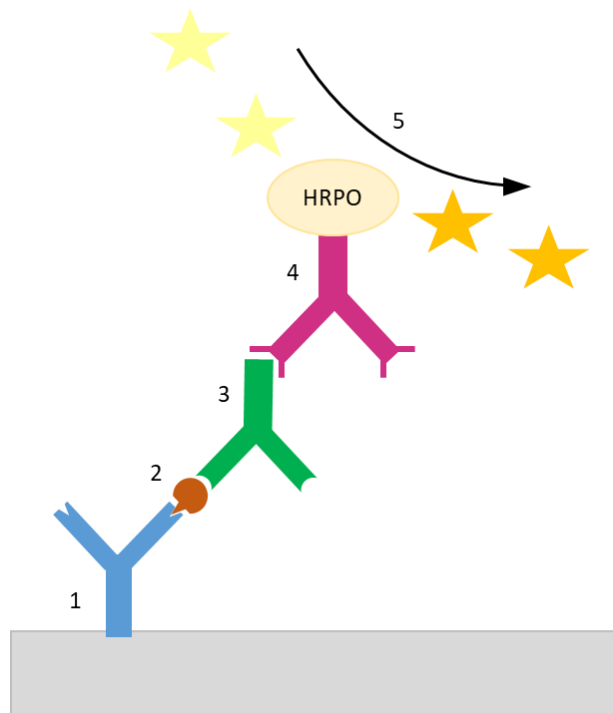
4 pav. Fluorescenciniu mikroskopu matomas citoplazminis ir perinuklearinis ANCA švytėjimas [90].

2.2.2 Endotelino tyrimas

Endotelinui-1 kraujo serume nustatyti buvo naudojamas daugiasluoksnis imunofermentinės analizės metodas (*angl. sandwich ELISA*). Tyrimui naudotas *Biomedica Medizinprodukte GmbH* įmonės *Endothelin (1-21) ELISA Kit (BI-20052)* rinkinys.

Kiekvienas rinkinio mikroplokštelės šulinėlis gamintojų padengtas polikloniniais antikūnais prieš endoteliną (5 pav. 1). Į kiekvieną plokštelės šulinėlį buvo įpiltas tam tikras kiekis pacientų kraujo serumo, kuriame, kaip tikimasi, yra endotelino molekulių, kurios turėtų prisijungti prie plokštelėje imobilizuotų antikūnų (5 pav. 2). Kartu įpilama ir monokloninių pelių antiendotelino antikūnų (5 pav. 3), kurie prisijungia prie antikūno-antigeno junginio „sumuštinio“ principu ir sudaro antikūno-antigeno-antikūno kompleksą. Toks molekulių mišinys inkubuotas kambario temperatūroje, kad susidarytų minėtasis kompleksas. Jei tiriamajame mėginyje nėra endotelino molekulių, tokiu atveju antikūno-antigeno-antikūno kompleksas nesusidaro. Po inkubacijos seka plovimo žingsnis. Naudojant plovimo buferį pašalintos nesurištos molekulės. Po to, į šulinėlius įpilta konjugato (antikūnai prieš pelių IgG su krienų peroksidaze - HRPO) (5 pav. 4), kuris prisijungia prie antikūno-antigeno-antikūno komplekso. Mišinys inkubuotas kambario temperatūroje, tada konjugato perteklius nuplautas plovimo buferiu. Galiausiai į šulinėlius įpiltas chromogeninis substratas (tetrametilbenzidino tirpalas – TMB), kuris, veikiamas krienų peroksidaze, keičia spalvą proporcingai endotelino kiekiui (5 pav. 5), ir reakciją stabdantis tirpalas.

Spalvos pokytis buvo aptinkamas spektrometru (tiriančios šviesos bangos ilgis – 450 nm). Endotelino koncentracija šulinėliuose buvo nustatoma remiantis užfiksuotu optiniu tankiu ir sudaryta kalibracine kreive.



5 pav. Daugiasluoksnės imunofermentinės analizės metodo principas. 1 – antikūnas prieš ET-1 antigeną, 2 – ET-1 baltymas, 3 – pelių antikūnas prieš ET-1, 4 – konjugatas (antikūnas prieš pelės IgG ir krienių peroksidazė), 5 – fermento katalizuojamas substrato spalvos pokytis [91].

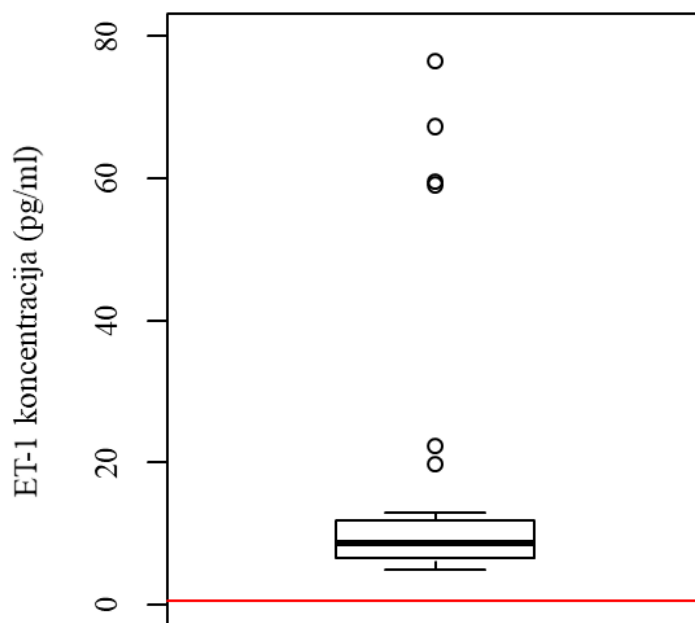
2.3 Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojantis programa „R“ (versija 3.5.3) ir jos papildiniu „R Commander“ (paketas „Rcmdr“, versija 2.5-3). Duomenų normalumas buvo tikrinamas naudojant Šapiro-Vilko (*angl. Shapiro-Wilk*) normalumo kriterijų. Duomenys, pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, buvo aprašomi naudojant vidurkį ir standartinį nuokrypį, o duomenys, kurių skirstinys statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo normaliojo skirstinio, buvo aprašomi mediana ir IQR (nurodant pirmąjį ir trečiąjį kvartilius). Sąsajos tarp endotelino, ENG, CRB ir neutrofilų skaičiaus buvo tirtos naudojant Spirmeno (*angl. Spearman rank-order*) koreliaciją. Koreliacijos stiprumas buvo aprašomas naudojant koreliacijos koeficientą r , o statistinis reikšmingumas – p reikšmę. Skirtumo tarp skirtingų grupių statistinis reikšmingumas buvo vertinamas naudojant Mano-Vitnio-Vilkoksono rangų sumų kriterijų (*angl. Mann-Whitney-Wilcoxon signed-rank test*), kuris buvo aprašomas nurodant Vilkoksono kriterijaus statistiką W ir p reikšmę. Kokybinių kintamųjų tarpusavio ryšio statistiniam reikšmingumui įvertinti taikytas Fišerio tikslusis kriterijus (*angl. Fisher's exact test*), o ryšio stiprumui aprašyti – Kramerio V (*angl. Cramer's V*) koeficientas. Skirtumas tarp imčių laikytas statistiškai reikšmingu, kai $p < 0,05$. Dalies grafikų Y ašyje pateikta logaritmuota ET-1 koncentracija siekiant išryškinti koncentracijos skirtumus ar jų nebuvimą tarp lyginamų grupių.

3. REZULTATAI

3.1. ET-1 ryšys su lytimi ir amžiumi

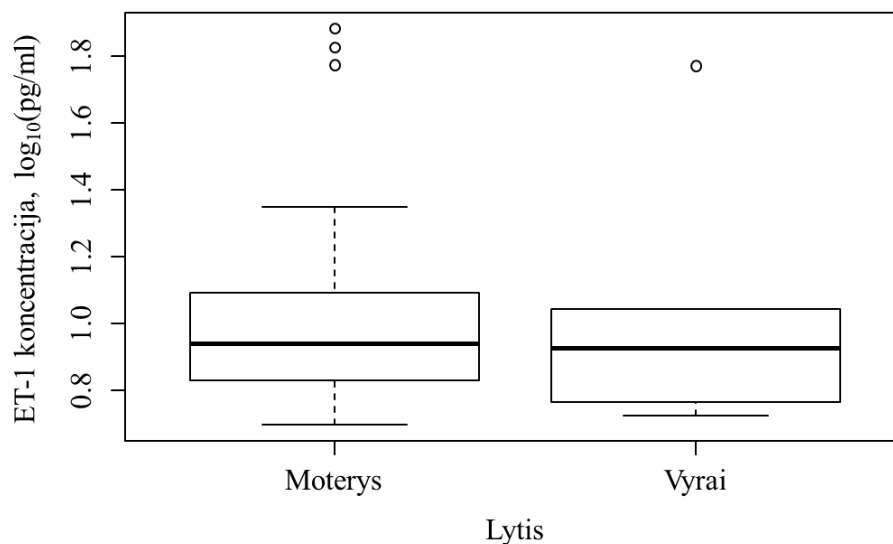
Visų tyrime dalyvavusių pacientų (29 pacientų) ET-1 koncentracija viršijo reagentų apraše rekomenduotą pamatinės vertės viršutinę ribą, nustatytą tiriant 70 sveikų donorų kraują, tai yra, 0,647 pg/ml (6 pav.). Pacientų ET-1 koncentracija rekomenduotą pamatinės vertės viršutinę ribą viršijo nuo 7 iki 118 kartų (minimali užfiksuota ET-1 koncentracija buvo 4,972 pg/ml, o maksimali – 76,534 pg/ml). Tiriamųjų ET-1 koncentracijos mediana buvo 8,743 pg/ml (IQR [6,598 – 11,843]).



6 pav. ET-1 koncentracijos pasiskirstymas tarp pacientų. Raudona linija grafiko apačioje žymi reagentų aprašyme rekomenduotą pamatinės vertės viršutinę ET-1 koncentracijos ribą (0,647 pg/ml).

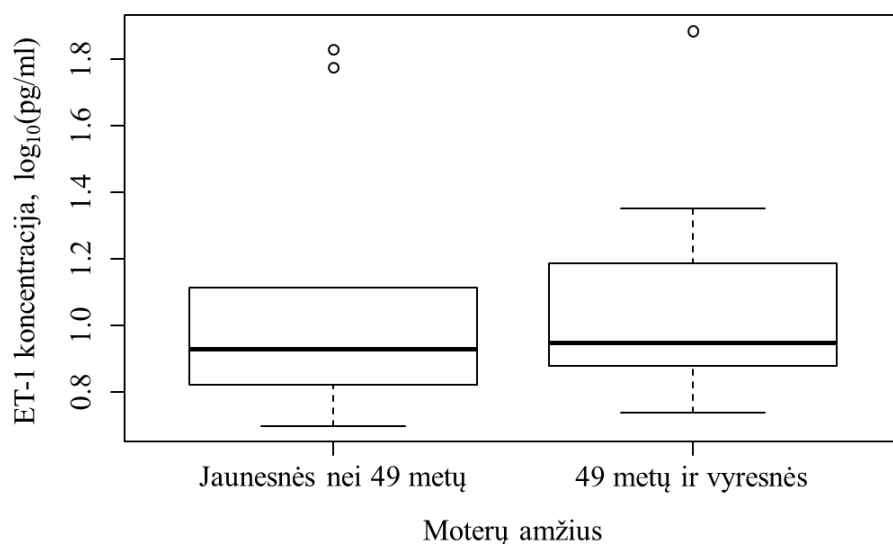
Iš visų tyrime dalyvavusių pacientų 79,3% (23 iš 29) buvo moterys ir 20,7% (6 iš 29) vyrai. Moterų amžiaus ANCA tyrimo atlikimo dieną vidurkis $54,30 \pm 15,45$ metai (21 moters amžiaus vidurkis, nes informacijos apie dviejų moterų amžių nebuvo gauta), o vyrų $66,17 \pm 14,13$ metai. Moterų amžius svyravo nuo 21 iki 77 metų, o vyrų nuo 48 iki 82 metų.

Lyginant ET-1 koncentraciją tarp lyčių statistiškai reikšmingo skirtumo neaptikta ($W = 76$, $p = 0,733$): moterų ET-1 koncentracijos mediana buvo 8,743 pg/ml (IQR [6,744 – 12,409]), o vyrų – 8,635 pg/ml (IQR [6,108 – 10,887]) (7 pav.).



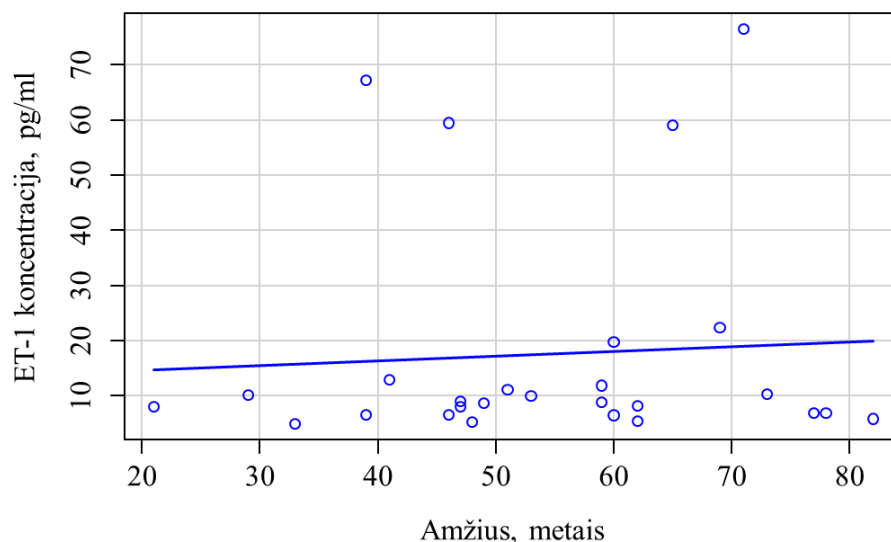
7 pav. ET-1 koncentracija pagal pacientų lytį.

Išanalizavus tyrime dalyvavusių moterų amžių, nustatyta, jog 47,6% (10 iš 21) moterų buvo jaunesnės nei 49 metai, o 52,4% (11 iš 21) buvo 49-erių arba vyresnės. Lyginant ET-1 koncentraciją tarp šių grupių statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo rasta ($W = 59$, $p = 0,810$) (8 pav.). Moterų iki 49 metų ET-1 koncentracijos mediana buvo 8,526 pg/ml (IQR [6,952 – 12,276]), o 49 metų bei vyresnių – 8,853 pg/ml (IQR [7,559 – 15,816]).



8 pav. ET-1 koncentracija pagal moterų amžių.

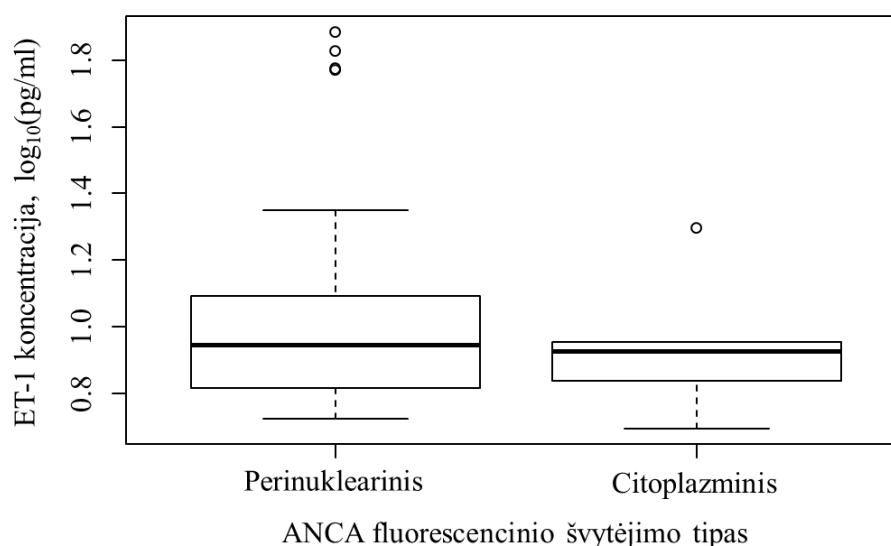
Be to, tiriant sąsają tarp endotelino koncentracijos ir visų pacientų amžiaus statistiškai reikšmingų rezultatų taip pat nebuvo gauta ($r = 0,04$, $p = 0,861$) (9 pav.).



9 pav. ET-1 koncentracijos sąsaja su pacientų amžiumi.

3.2. ET-1, ANCA fluorescencinio švytėjimo tipo ir klinikinės būklės sąsaja

Išanalizavus duomenis, c-ANCA fluorescencinio švytėjimo tipas buvo nustatytas 20,7% (6 iš 29) pacientų, o p-ANCA – 79,3% (23 iš 29) pacientų. Lyginant endotelino koncentraciją tarp ANCA tipų, statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo aptikta ($W = 58$, $p = 0,581$): c-ANCA ET-1 koncentracijos mediana – 8,486 pg/ml (IQR [7,224 – 8,955]), p-ANCA – 8,853 pg/ml (IQR [6,580 – 12,409]) (10 pav.).



10 pav. ET-1 koncentracija pagal ANCA švytėjimo tipą.

Išanalizavus pacientų, kuriems buvo nustatytas c-ANCA fluorescencinis švytėjimas, duomenis nustatyta, kad iš jų 66,7% (4 iš 6) sirgo I grupei priskirtomis ligomis, o 33,3% (2 iš 6)

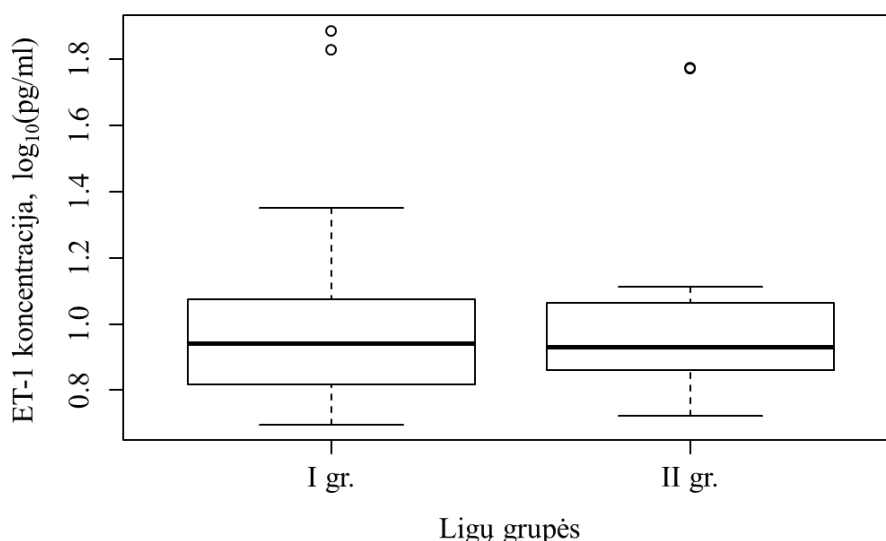
II grupei priskirtomis ligomis. Taip pat išanalizavus pacientų, kuriems buvo nustatytas p-ANCA tipas, duomenis nustatyta, kad 56,5% (13 iš 23) iš jų sirgo I grupei priskirtomis ligomis, o 43,5% – II grupei (1 lentelė). Vis dėlto apskaičiuota asociacija tarp ANCA tipo ir ligų grupės buvo labai silpna (Kramerio $V = 0,083$) ir statistiškai nereikšminga ($p > 0,999$) (1 lentelė).

1 lentelė. Pacientų porinė dažnių lentelė pagal ANCA fluorescencinius švytėjimo tipus ir ligų grupes.

| ANCA tipas | Ligų grupės | |
|------------|-------------|--------|
| | I gr. | II gr. |
| c | 4 | 2 |
| p | 13 | 10 |

Pastaba: I gr. – su ANCA susiję vaskulitai, II gr. – jungiamojo audinio, raumenų, skeleto ir žarnyno ligos.

Lyginant endotelino koncentracijas tarp skirtingų ligų grupių (I gr. ir II gr.), statistiškai reikšmingo skirtumo aptikta nebuvo ($W = 101$, $p = 0,983$): I grupės ET-1 koncentracijos mediana – 8,743 pg/ml (IQR [6,563 – 11,843]), II grupės mediana – 8,541 pg/ml (IQR [7,660– 10,986]) (11 pav.). I grupei buvo priskirti 58,6% (17 iš 29) pacientų, o II grupei – 41,4% (12 iš 29) pacientų.

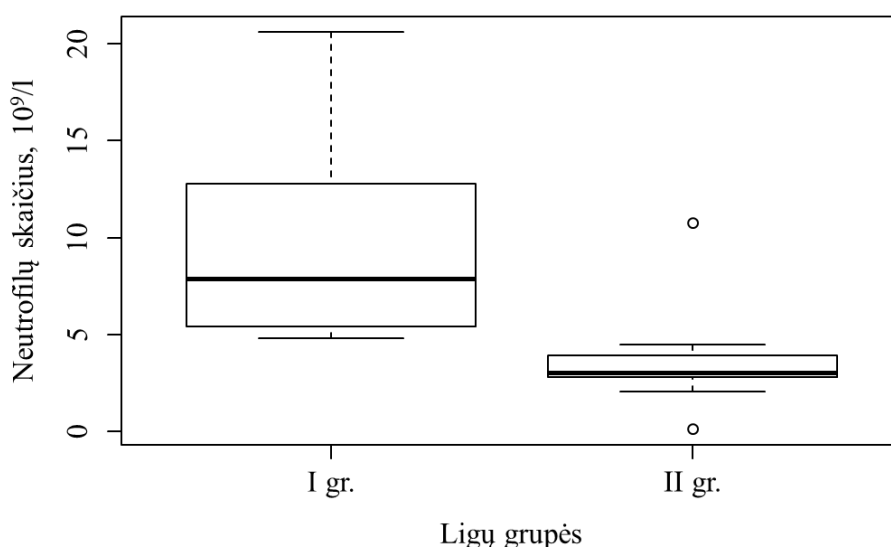


11 pav. ET-1 koncentracijos skirtingose ligų grupėse.

3.3. ET-1 ryšys su uždegiminiais žymenimis

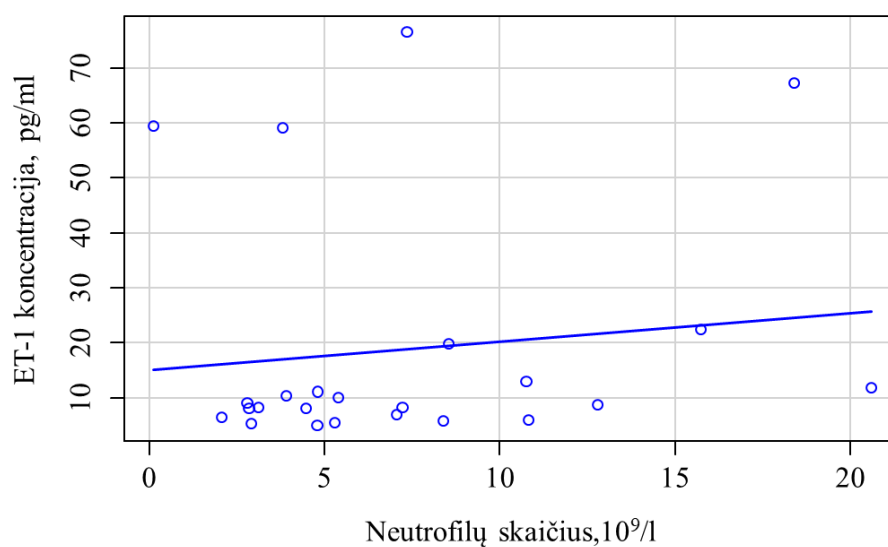
Informacija apie neutrofilų skaičių kraujyje buvo gauta iš 24 pacientų ligos istorijų. Šių pacientų neutrofilų skaičiaus mediana lygi $5,35 \times 10^9/l$ (IQR [3,65 – 9,10]). Remiantis Laboratorinės medicinos centro pateiktomis tyrimų normomis, neutrofilų skaičius laikomas normaliu, jei patenka į intervalą $1,5 – 6,0 \times 10^9/l$ [92]. 45,83 % (11 iš 24) mūsų tiriamųjų turėjo padidėjusį neutrofilų skaičių, o 4% (1 iš 24) turėjo itin mažą neutrofilų skaičių, tai yra, $0,12 \times 10^9/l$.

Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp skirtingų ANCA švytėjimo tipų ir neutrofilų skaičiaus nebuvo aptikta ($W = 43$, $p = 0,783$): neutrofilų skaičiaus mediana c-ANCA grupėje buvo $4,8 \times 10^9/l$ (IQR [3,13 – 8,54]), o p-ANCA grupėje $5,40 \times 10^9/l$ (IQR [3,87 – 9,58]). Vis dėlto buvo gautas statistiškai reikšmingas skirtumas ($W = 131$, $p < 0,001$) tarp skirtingų ligų grupių neutrofilų skaičiaus. Pacientų, priskirtų I grupei, neutrofilų skaičiaus mediana buvo $7,88 \times 10^9/l$ (IQR [5,82 – 12,31]), o II grupei – $3,02 \times 10^9/l$ (IQR [2,81 – 3,90]) (12 pav.).



12 pav. Neutrofilų skaičiaus pasiskirstymas skirtingose klinikinėse grupėse.

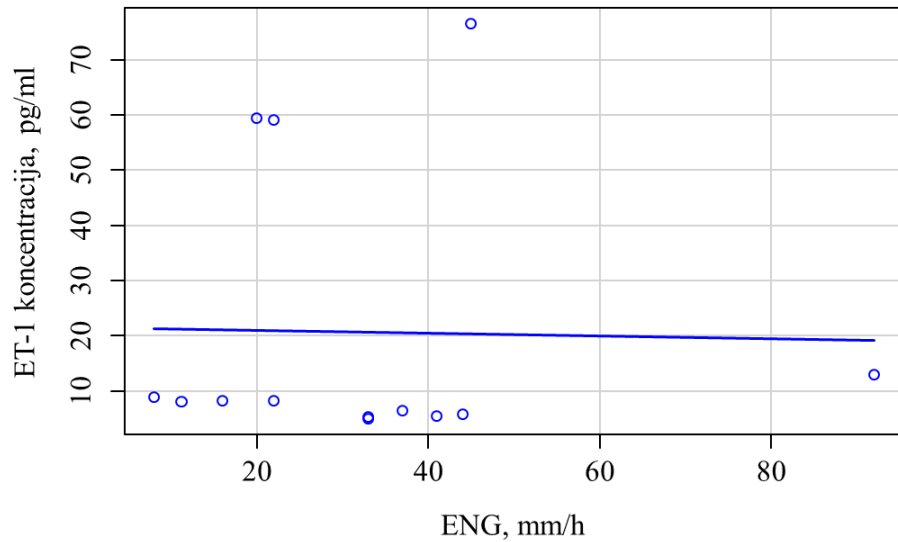
Tiriant sąsają tarp ET-1 koreliacijos ir neutrofilų skaičiaus, buvo nustatyta, jog šie du žymenys pasižymi silpnu tarpusavio ryšiu ($r = 0,27$), tačiau aptiktas ryšys nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,210$) (13 pav.).



13 pav. ET-1 koncentracijos ryšys su pacientų neutrofilų skaičiumi.

Tyrime buvo analizuoti 13 pacientų ENG rezultatai. Šių pacientų ENG mediana buvo 33 mm/h (IQR [20 – 41]). Moterų (10 iš 13) ENG mediana 27,5 mm/h (IQR [17 – 40]), o vyrų (3 iš 13) didesnė nei moterų – 33,0 mm/h (IQR [27,5 – 38,5]), tačiau statistiškai reikšmingo ENG skirtumo tarp lyčių nebuvo ($W = 12$, $p = 0,611$). Remiantis Laboratorinės medicinos centro pateiktomis tyrimų normomis, rekomenduojamas ENG moterims yra ≤ 20 mm/h, o vyrams ≤ 10 mm/h [92]. Taigi, visų mūsų tiriamųjų vyrų ENG reikšmės buvo virš normos, kaip ir 60,0% (6 iš 10) moterų. Iš viso ENG normą viršijo 69,2% pacientų (9 iš 13).

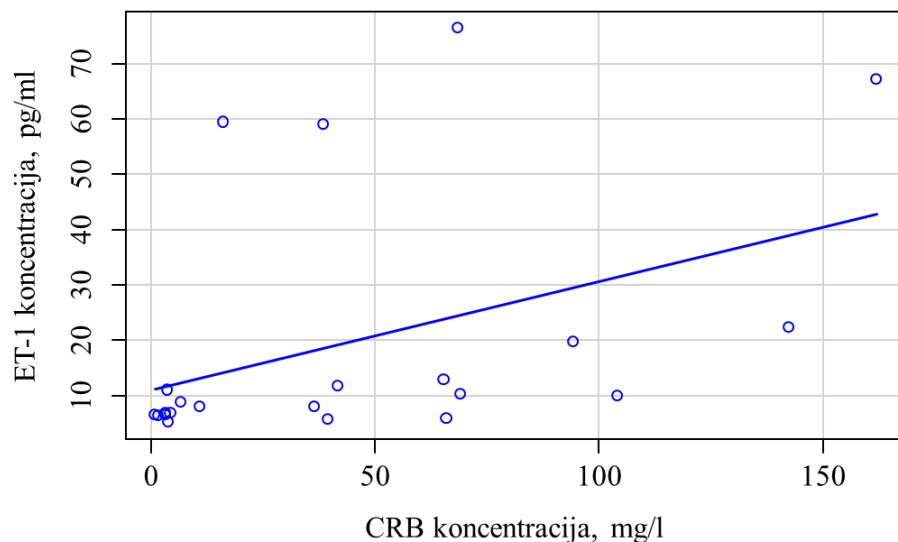
Ieškant ryšio tarp endotelino koncentracijos ir ENG, nustatytas silpnas atvirkštinis ($r = -0,10$), tačiau statistiškai nereikšmingas ($p = 0,754$) ryšys (14 pav.).



14 pav. ET-1 koncentracijos ryšys su pacientų neutrofilų skaičiumi.

Tyrimo metu buvo analizuoti 22 pacientų CRB rezultatai. Šių pacientų CRB mediana 37,4 mg/l (IQR [3,9 – 67,8]). Remiantis Laboratorinės medicinos centro pateiktomis tyrimų normomis, rekomenduojama CRB koncentracija yra ≤ 5 mg/l [93]. Mūsų tiriamųjų grupėje 68,2% (15 iš 22) pacientų CRB koncentracija kraujo serume buvo padidėjusi.

Išanalizavus duomenis, buvo aptiktas statistiškai reikšmingas ($p = 0,005$) vidutiniškai stiprus ($r = 0,59$) ryšys tarp endotelino ir CRB koncentracijų (15 pav.).



15 pav. ET-1 koncentracijos ryšys su pacientų CRB koncentracija.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Mokslininkų bendruomenėje manoma, jog ET-1 koncentracija gali būti naudojama kaip kraujagyslių pažeidimo, endotelio disfunkcijos žymuo [6,9,94–96]. Mūsų tyrimo hipotezė buvo, jog ET-1 ir ANCA yra susiję patogenetiškai – jog ANCA inicijuotas endotelio pažeidimas prisideda prie padidėjusio ET-1 išsiskyrimo. Tyrimo tikslas buvo tai patikrinti tiriant ET-1 koncentraciją ANCA teigiamiems asmenims ir vertinant ET-1 ryšį su uždegiminiais žymenimis (neutrofilų skaičiumi, CRB ir ENG).

Išmatavus ET-1 koncentraciją 29 pacientų serume buvo nustatyta, jog visų tyrimo dalyvių ET-1 koncentracija viršijo reagentų apraše nurodytą rekomenduotiną pamatinę viršutinę ribą nuo 7 iki 118 kartų. Nors, kaip anksčiau jau buvo minėta, ET-1 gamina įvairios organizmo ląstelės, tačiau manome, jog išmatuota endotelino koncentracija atspindi endotelio išskirtą ET-1, kadangi visi tyrime dalyvavę pacientai buvo ANCA teigiami, o, kaip žinoma iš literatūros, ANCA prisideda prie kraujagyslių endotelio pažeidimo [42,43,69,70]. Statistiškai reikšmingą ET-1 koncentracijos padidėjimą aptiko ir kiti mokslininkai tyrę pacientus, kurie sirgo sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis: sisteminė raudonąja vilklige (1,4 karto) [9], reumatoidiniu artritu (3,5 karto) [10], sisteminė skleroze (5 kartus) [97], nediferencijuotomis jungiamojo audinio ligomis (3,7 karto) [98], Bahceto liga (3,8 karto) [11], Reino liga (1,5-1,6 karto) [96,99], tačiau jų užfiksuotos vidutinės ET-1 vertės kontrolinių grupių vertes viršijo kur kas mažiau kartų (nurodyta skliaustuose) nei mūsų tyrime (mūsų tyrime – kontrolinę reikšmę viršijo vidutiniškai 13,5 karto).

ET-1 koncentraciją palyginus tarp lyčių, statistiškai reikšmingi rezultatai mūsų tyrime nebuvo gauti ($p = 0,733$). ET-1 koncentracijos skirtumai tarp lyčių yra grindžiami tuo, kad ET-1 sekrecijai įtakos turi lytiniai hormonai [100]. Iširta, jog testosteronas skatina ET-1 sekreciją, tuo tarpu estradiolis ją mažina, arba neutralizuoja angiotenzino II stimuliacijos efektą [84–86]. Vis dėlto minėti autoriai tyrimus atliko su ląstelių kultūromis, o ne sergančiais žmonėmis. Daugumą (79,3%) mūsų tiriamųjų sudarė moterys ir tai atspindi kituose tyrimuose nustatytus skaičiavimus, jog moterys autoimuninėmis ligomis serga dažniau nei vyrai, o sisteminės vilkligės atveju moterų ir vyrų dažnis yra net 9:1 [101,102].

Palyginus ET-1 koncentracijas skirtingose moterų amžiaus grupėse, kur skiriamoji riba buvo parinktas vidutinis menopauzės pradžios amžius, statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo aptikta ($p = 0,810$) ir nepasitvirtino literatūroje aprašomos idėjos, jog prasidėjus menopauzei moterų organizme mažėja estrogeno, kuris turi slopinamąjį ET-1 poveikį, todėl pomenopauziniame laikotarpyje ET-1 koncentracija turėtų reikšmingai padidėti [86,103]. Vis dėlto mūsų tyrime ET-1 koncentracijos skirtumai tarp lyčių ir amžiaus galėjo būti užmaskuoti patologinio efekto, tai yra, jog su ANCA susijęs endotelio pažeidimas sukėlė kur kas didesnę ET-1 sekreciją nei ji natūraliai padidėja dėl amžiaus ar lyčių skirtumų. Patikrinus, ar ET-1 ir amžių

sieja ryšys, taip pat buvo gautas statistiškai nereikšmingas rezultatas ($p = 0,861$), kuris mūsų tyrimo atveju rodo, jog ET-1 koncentracija ir pacientų amžius nekoreliuoja tarpusavyje.

Tarp mūsų tirtų pacientų dominavo p-ANCA fluorescencinis švytėjimo tipas. Norint patikrinti, ar ET-1 koncentracijos priklauso nuo nustatyto ANCA tipo buvo atlikta analizė, kurios rezultatas parodė, jog ET-1 koncentracija statistiškai reikšmingai nesiskiria tarp skirtingų ANCA fluorescencinio švytėjimo tipų ($p = 0,581$). Iš to galima daryti išvadą, jog ANCA patogenezė endotelio atžvilgiu yra panaši, nepriklausomai nuo to prieš kurį antigeną ANCA susidaro, nors literatūros duomenimis PR3-ANCA ir MPO-ANCA serotipai yra genetiškai nutolę vienas nuo kito [55].

Atliktame tyrime išskyrus pacientų grupes pagal klinikinę būklę į I (AAV) ir II (JARSŽ) grupes buvo nustatyta, jog šios ligų grupės yra heterogeniškos ANCA fluorescencinio švytėjimo tipų atžvilgiu ir nei vienoje pacientų grupėje nedomino kažkuris vienas ir nustatytų ANCA tipų (c ar p). Mūsų tyrime nustatyta, jog asociacija tarp klinikinės būklės ir ANCA tipo buvo statistiškai nereikšminga ($p > 0,999$). Šie gauti rezultatai atitinka literatūroje pateiktą informaciją, jog AAV yra heterogeniška ligų grupė, kur vienoms ligoms (pavyzdžiui, granulomatozei su poliangitu) labiau būdingas citoplazminis švytėjimas, o kitoms (pavyzdžiui, mikroskopiniui poliangitui) – perinuklearinis. Heterogeniškumas pastebėtas net ir vienos klinikinės diagnozės ribose, kai sergant granulomatoze su poliangitu c-ANCA tipas nustatomas maždaug 85% atveju, p-ANCA 10 %, o 5% – ANCA neigiami. Panaši tendencija stebima tiriant ir kitas jungiamojo audinio ligas, kurioms būdingi ANCA antikūnai: Reino ligą, opinį kolitą, mazginį poliartritą [99,104–106].

Kadangi neradome asociacijos tarp nustatytų ANCA fluorescencinio švytėjimo tipų ir klinikinės būklės bei reikšmingų skirtumų tarp ET-1 koncentracijos ir ANCA fluorescencinio švytėjimo tipų, nenuostabu, jog statistiškai reikšmingo ET-1 koncentracijos skirtumo nebuvo aptikta ir jas lyginant išskirtose klinikinių būklių grupėse (AAV ir JARSŽ). Tai papildė anksčiau minėtą išvadą, jog ET-1 koncentracijos pokyčiai nėra specifiski klinikiniams požymiams (pagal kuriuos priskirta klinikinė būklė), o abejose ligų grupėse ANCA ir ET-1 priklausomybė yra panaši.

Diagnozuojant su ANCA susijusias ligas ir vertinant ligos pažengimo laipsnį ar gydymo veiksmingumą atliekami ir uždegiminių žymenų tyrimai. Populiariausi iš jų – neutrofilų/leukocitų skaičius, CRP ir ENG [107]. Siekiant įvertinti ET-1 ryšį su ANCA inicijuotais procesais buvo analizuojamas nustatytos pacientų ET-1 koncentracijos ryšys su kitais uždegiminiais rodikliais. Nors literatūroje rašoma, jog neutrofilai atlieka esminį vaidmenį ANCA patogenezėje, tačiau kiek mažiau nei pusė (45,83%) mūsų tirtų pacientų turėjo padidėjusį neutrofilų skaičių kraujyje. Analizuojant neutrofilų skaičių c-ANCA ir p-ANCA fluorescencinio švytėjimo tipų grupėse statistiškai reikšmingo skirtumo neaptikta ir patvirtina anksčiau minėtas

išvadas, jog ANCA patogenezė reikšmingai nepriklauso nuo to, prieš kurį antigeną (PR3 ar MPO) susidaro ANCA. Vis dėlto statistiškai reikšmingai didesnis neutrofilų skaičiaus buvo gautas I (AAV) grupėje lyginant su II (JARSŽ) grupe ($p < 0,001$). Šie rezultatai parodo, jog su ANCA susijusių vaskulitų patogenezėje dalyvauja daugiau neutrofilų nei kitoje ligų grupėje, o tai galėtų būti dėl to, jog galbūt šiuos ANCA vaskulitus inicijavo bakterinė infekcija, arba tai, jog AAV sergantys asmenys yra jautresni antrinėms infekcijoms ir neutrofilų skaičius padidėjo dėl jau po ANCA susidarymo inicijuoto endotelio pažeidimo, pavyzdžiui, granulomatozei su poliangitu dažnai būdingas viršutinių kvėpavimo takų ir plaučių pažeidimai, o dėl to į organizmą gali lengviau pakliūti infekcija [108,109]. Ieškant priklausomybės tarp ET-1 koncentracijos ir visų pacientų neutrofilų skaičiaus, statistiškai reikšmingi rezultatai nebuvo gauti ($p = 0,210$).

Kitas tyrime analizuotas uždegiminis žymuo – ENG. Padidėjusį ENG turėjo 69,2% pacientų. Analizuojant ET-1 koncentracijos ryšį su ENG, buvo gauta silpna atvirkštinė koreliacija, tačiau ji buvo statistiškai nereikšminga ($p = 0,754$). Kitų mokslininkų tyrimų duomenimis ENG nėra specifiskas endotelio uždegimo žymuo ir jam nepakanka galios vaskulitus diferencijuoti nuo kitų uždegimų ir infekcijų. Be to, ENG yra netiesioginis uždegiminis žymuo, todėl jo reikšmės gali nekoreliuoti su uždegimo stiprumu ir tam įtakos gali turėti, pavyzdžiui, eritrocitų forma, dydis ar žemas hematokritas [107,110].

Vienintelis statistiškai reikšmingas ryšys tiriant sąsajas tarp uždegiminių žymenų, buvo gautas analizuojant ET-1 koncentraciją ir CRB ($p = 0,005$, $r = 0,59$). Tai gali patvirtinti literatūroje minimas prielaidas apie ET-1 sąsają su CRB. CRB sintezę kepenyse inicijuoja citokinai IL-6, IL-1 ir TNF- α , kurie ANCA teigiamų pacientų atveju yra sekretuojami ANCA aktyvintų monocitų ar neutrofilų aktyvintų makrofagų. Tie patys citokinai skatina ir ET-1 gamybą, o iš endotelio ląstelių išskirtas ET-1 skatina makrofagus išskirti dar daugiau TNF- α , kuris tuo pačiu skatina dar didesnę CRB sintezę, o CRB aktyvina dar daugiau neutrofilų. [19,69,105,111,112]. Kitų mokslininkai taip pat aptiko reikšmingą asociaciją tarp ET-1 ir CRB padidėjimo pacientuose su kraujagyslių pažeidimais [96,113,114]. Vis dėlto tik 68,2% tyrimo pacientų turėjo padidėjusią CRB koncentraciją. Tai reiškia, jog CRB nėra jautrus visiems vaskulitų atvejams.

Svarbu paminėti tai, jog visi nagrinėti uždegiminiai rodikliai (neutrofilų skaičius, CRB, ENG) nėra specifiski endotelio uždegimo žymenys ir jų padidėjimas gali būti nulemtas kitų aplinkybių – amžiaus, lyties, lydinčių ligų ir infekcijų [107].

Aprašant tyrimo duomenis buvo naudota mediana bei tarpkvartilinis plotis, tai yra, pirmasis ir trečiasis kvartilis, toks duomenų aprašymo tipas pasirinktas todėl, kad visi (išskyrus amžiaus) duomenys nebuvo pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį ir tokiu atveju mediana geriau atspindi duomenų vidurines reikšmes nei vidurkis.

Šio tyrimo naujumas buvo tai, kad tiriamųjų grupei, kurią sudarė ANCA teigiami pacientai, buvo siekiama nustatyti ar kasdieninėje praktikoje kol kas netaikomas ET-1 žymuo siejasi su ANCA patogeneze ir diagnostikoje naudojamais uždegiminiais žymenimis. Tyrimo trūkumas – nedidelis tiriamųjų skaičius, tačiau tyrimai su autoimuninėmis ligomis yra sudėtingi, nes jos yra retos ir surinkti tyrimui reikalingą grupę yra sunku. Tolesnių tyrimų metu būtų galima įvertinti ET-1 ryšį su AAV priklausančiomis ligomis atskirai, ET-1 ryšį su organų sistemų pažeidimais, kaip ET-1 atspindi gydymo efektyvumą, ar turi galios prognozuoti remisiją ANCA teigiamiems pacientams. Be to, įvairūs literatūros šaltiniai teigia, jog ET-1 koncentracija serume neatspindi viso organizme endotelio išskirto ET-1, kadangi jis daugiausia veikia lokaliai (autokriniškai/parakriniškai), todėl būtų naudinga ištirti ET-1 koncentraciją biopsinėje medžiagoje paimtoje iš ANCA teigiamų pacientų [80,112].

IŠVADOS

1. Visiems tyrime dalyvavusiems pacientams nustatyta padidėjusi ET-1 koncentracija, todėl galima teigti, jog ET-1 yra artimai susijęs su ANCA asocijuotų ligų patogenezė. Reikšmingų skirtumų tiriant ET-1 koncentraciją skirtingose amžiaus grupėse ir tarp lyčių nenustatyta.

2. Palyginus ET-1 koncentraciją suskirstytose ligų grupėse ir atsižvelgiant į ANCA fluorescencinio švytėjimo tipą, reikšmingų skirtumų neaptikta, todėl galima teigti, jog ET-1 koncentracijos padidėjimas gali būti būdingas kelioms ligų grupėms, o endotelio pažeidimo stiprumas nepriklauso nuo ANCA serotipo.

3. Nustatyta ET-1 koreliacija su CRP. Tai patvirtina prielaidas, jog ET-1 ir CRP sintezė yra susijusi tarpusavyje ir abu žymenys galėtų būti naudojami ANCA teigiamų pacientų uždegiminiam aktyvumui stebėti.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju visiems prisidėjusiems prie šio tyrimo rengimo, vykdymo ir duomenų analizės. Visų pirma norėčiau padėkoti savo vadovei dr. Loretai Bagdonaitei už paskatinimą domėtis imunologija bei naudingus patarimus rengiant baigiamąjį darbą. Dėkoju Laboratorinės medicinos centro medicinos biologei Nijolei Gerčiukaitei ir biomedicinos technologei Irenai Šimkovičiūtei už pagalbą atliekant endotelino ir ANCA tyrimus bei supažindinimą su tyrimų atlikimo metodikomis. Taip pat noriu padėkoti Gyvybės mokslų centro lekt. Vilmantui Gėgžnai už patarimus pateikiant tyrimų rezultatus. Ir didelį ačiū noriu tarti šeimai, kuri paskatino pasirinkti magistro studijas bei kurso kolegoms, kurie leisdavosi į profesines diskusijas ir skatino dar didesnę žingeidumą.

SANTRAUKA

ENDOTELINO-1 KONCENTRACIJOS RYŠYS SU UŽDEGIMINIAIS ŽYMENIMIS ANCA TEIGIAMiems PACIENTAMS

Rūta Rutkūnaitė

Įvadas: su antikūnais prieš neutrofilų citoplazmos antigenus (ANCA) susiję vaskulitai – tai autoimuninės ligos, sukeliančios smulkiųjų kraujagyslių uždegimą, kuris dažniausiai pažeidžia tankų kapiliarų tinklą turinčius organus – inkstus ir plaučius. Šių retų ligų ankstyva diagnostika ir gydymas yra itin svarbus, nes užsitęsęs ligai atsiranda negrįžtami gyvybiškai svarbių organų pakitimai. Endotelinas-1 (ET-1) – ne tik stiprus vazokonstriktorius, bet ir uždegiminis žymuo, kuris kol kas kasdieninėje praktikoje nenaudojamas, tačiau, pasak mokslinių straipsnių, galėtų būti taikomas kraujagyslių endotelio pažeidimui nustatyti. Remiantis literatūros šaltiniuose pateikta informacija, buvo iškelta šio tyrimo hipotezė: ET-1 ir ANCA yra susiję patogenetiškai – ANCA inicijuotas endotelio pažeidimas prisideda prie padidėjusio ET-1 išsiskyrimo.

Tyrimo tikslas: įvertinti endotelino ir ANCA patogenezės sąsają tiriant ET-1 koncentraciją ANCA teigiamiems asmenims ir vertinant ET-1 ryšį su uždegiminiais žymenimis.

Metodai: tiriamųjų grupę sudarė 29 ANCA teigiami pacientai (79,3% moterų ir 20,7% vyrų): moterų amžiaus vidurkis $54,30 \pm 15,45$ metai, o vyrų $66,17 \pm 14,13$ metai. Pacientų serume ANCA buvo nustatomi netiesioginės imunofluorescencijos metodu, o ET-1 koncentracija – daugiasluoksnės imunofermentinės analizės metodu. Informacija apie pacientų uždegiminių žymenų (ENG, CRB ir neutrofilų skaičių) vertes buvo surinkta remiantis vidinėje ligoninės informacinėje sistemoje pateiktais duomenimis. Statistinė analizė buvo atlikta taikant neparimetrinius metodus, kadangi dauguma duomenų nebuvo pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį. Skirtumas tarp imčių laikytas statistiškai reikšmingu, kai $p < 0,05$.

Rezultatai: visų tyrime dalyvavusių pacientų ET-1 koncentracija viršijo reagentų apraše rekomenduotą pamatinės vertės viršutinę ribą (0,647 pg/ml). ET-1 koncentracija statistiškai reikšmingai nesiskyrė nei tarp lyčių nei tarp skirtingų moterų amžiaus grupių. Statistiškai reikšmingų ET-1 koncentracijos skirtumų nebuvo aptikta ir pacientus suskirsčius į grupes pagal ANCA fluorescencinio švytėjimo tipą ar nustatytas ligas. Tiriant endotelino sąsają su uždegiminiais žymenimis vienintelis statistiškai reikšmingas vidutiniškai stiprus ryšys buvo aptiktas tarp endotelino ir CRB koncentracijos ($r = 0,59$, $p = 0,005$).

Išvados: remiantis gautais rezultatais galima teigti, jog ET-1 yra artimai susijęs su ANCA asocijuotų ligų patogenezė ir tam reikšmingos įtakos neturi nei amžius, nei lytis. Padidėjusi ET-1 koncentracija gali būti būdinga kelioms ligų grupėms, o tai, kaip stipriai pažeidžiamas endotelis, nepriklauso nuo ANCA serotipo. Be to, CRB ir ET-1 sintezė yra galimai susijusi tarpusavyje ir abu žymenys galėtų būti naudojami ANCA teigiamų pacientų uždegiminių aktyvumui stebėti.

Raktiniai žodžiai: endotelinas, ANCA, vaskulitas, uždegiminiai žymenys.

SUMMARY

THE RELATIONSHIP BETWEEN ENDOTHELIN-1 AND INFLAMMATORY MARKERS IN ANCA POSITIVE PATIENTS

Rūta Rutkūnaitė

Background: vasculitides associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are systemic autoimmune diseases that affect small to medium sized blood vessels. Although they are relatively rare, they must be diagnosed and treated early because untreated disease may rapidly develop into multiple organ failure and death. Endothelin-1 (ET-1) is not only a potent endogenous vasoconstrictor, which mediates proliferation and fibrosis of vascular wall cells, but also is a proinflammatory protein, which leads to activation of macrophages and adhesion of neutrophils. ET-1 is not a marker used in a daily routine, but, according to scientists, it can be used to determined endothelial damage.

The aim of the study was to assess the relationship of endothelin and ANCA by investigating ET-1 concentration and its connection with inflammatory markers in ANCA positive patients.

Methods: the study included 29 ANCA positive patients (79.3% women and 20.7% men). The average age of women was 54.30 ± 15.45 years, the average age of men was 66.17 ± 14.13 years. ANCA existence in the serum was determined by indirect immunofluorescence whereas the serum levels of ET-1 (pg/ml) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The information about patients' inflammatory markers (C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate, neutrophil number) was taken from the information system of the hospital. The statistical analysis was based on non-parametric methods, because data did not meet the assumption of normality. The results were considered as statistically significant, if $p < 0.05$.

Results: the levels of ET-1 were found higher than the upper limit of recommended range (0.647 pg/ml) in all our patients. There was no significant difference in ET-1 concentration between gender or age the same as between different ANCA types or groups of diseases. We found a statistically significant and moderate relationship between ET-1 and CRP concentrations ($r = 0.59$, $p = 0.005$). This was the only one statistically significant linkage between ET-1 and inflammatory markers.

Conclusions: the results suggest that ET-1 is closely related to pathogenesis of ANCA and has no significant effect on age or gender in ANCA positive patients. Increased ET-1 concentration may be found in several disease groups, and the severity of endothelial damage is independent of the ANCA serotype. In addition, results suggest that CRP and ET-1 synthesis could be also related. This shows that both ET-1 and CRP may be used to monitor inflammation in ANCA positive patients.

Key words: endothelin, ANCA, vasculitis, inflammatory markers.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Rose NR. Autoimmune Diseases. In: *International Encyclopedia of Public Health*. Elsevier, 2008: 267–71.
2. Higienos instituto sveikatos statistikos duomenų portalas 2018 duomenys. Prieiga: <https://stat.hi.lt/>
3. Savage CO, Harper L, Cockwell P, Adu D, Howie AJ. ABC of arterial and vascular disease: vasculitis. *BMJ (Clinical research ed.)* 2000; 320: 1325–8.
4. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis & Rheumatism* 2013; 65: 1–11.
5. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411–5.
6. Cotie LM, Currie KD, McGill GM, Cameron AJ, Mcfadden AS, Phillips SM, et al. Associations between measures of vascular structure and function and systemic circulating blood markers in humans. *Physiol Rep* 2016; 4: 1–7.
7. Anggrahini DW, Emoto N, Nakayama K, Widyantoro B, Adiarto S, Iwasa N, et al. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. *Cardiovascular Research* 2009; 82: 143–51.
8. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin System: The Double-Edged Sword in Health and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2001; 41: 851–76.
9. Hajjalilo M, Tayari P, Ghorbanihaghjo A, Khabbazi A, Malek Mahdavi A, Rashtchizadeh N. Relationship between serum vascular cell adhesion molecule-1 and endothelin-1 levels with organ involvement and disease activity in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2018; 27: 1918–25.
10. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S, Ciolkiewicz M. A study on vascular endothelial growth factor and endothelin-1 in patients with extra-articular involvement of rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* 2006; 25: 314–9.
11. Hodeib AA, Elsharawy TA, Fawzi HA. Assessment of serum homocysteine, endothelin-1, and nitric oxide levels in behçet's disease. *Indian journal of dermatology* 2010; 55: 215–20.
12. Li L, Chu Y, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF. Endothelin-1 Stimulates Arterial VCAM-1 Expression Via NADPH Oxidase-Derived Superoxide in Mineralocorticoid Hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 997–1003.

13. Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends in pharmacological sciences* 2004; 25: 219–24.
14. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. *Pharmacological reviews* 2016; 68: 357–418.
15. Freeman BD, Machado FS, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. *Life sciences* 2014; 118: 110–9.
16. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Research and Therapy* 2007; 9: 1–8.
17. Sokolovsky M, Shraga-Levine Z. Sarafotoxins and Their Relationship to the Endothelin Family of Peptides. In: *Endothelin and Its Inhibitors*. 2001: 11–34.
18. Masaki T. The discovery of endothelins. *Cardiovascular Research* 1998; 39: 530–3.
19. Kowalczyk A, Kleniewska P, Kolodziejczyk M, Skibska B, Goraca A. The Role of Endothelin-1 and Endothelin Receptor Antagonists in Inflammatory Response and Sepsis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2015; 63: 41–52.
20. Petkova SB, Huang H, Factor SM, Pestell RG, Bouzahzah B, Jelicks LA, et al. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *International Journal for Parasitology* 2001; 31: 499–511.
21. Hammond TR, Mcellin B, Morton PD, Raymond M, Dupree J, Gallo V. Endothelin-B Receptor Activation in Astrocytes Regulates the Rate of Oligodendrocyte Regeneration during Remyelination. *CellReports* 2015; 13: 2090–7.
22. Kuddus RH, Nalesnik MA, Subbotin VM, Rao AS, Gandhi CR. Enhanced synthesis and reduced metabolism of endothelin-1 (ET-1) by hepatocytes - an important mechanism of increased endogenous levels of ET-1 in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2000; 33: 725–32.
23. Aktar MK, Kido-Nakahara M, Furue M, Nakahara T. Mutual upregulation of endothelin-1 and IL-25 in atopic dermatitis. *Allergy* 2015; 70: 846–54.
24. Chen IC, Lin YT, Huang JS, Wu BN, Hsu JH, Tan MS, et al. Decreased Ambient Oxygen Tension Alters the Expression of Endothelin-1, iNOS and cGMP in Rat Alveolar Macrophages. *Int. J. Med. Sci* 2019; 16: 443–9.
25. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, et al. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 2004; 432: 512–6.
26. Rajamäki K, Lappalainen J, Öörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al. Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS ONE* 2010; 5:

e11765.

27. Houde M, Desbiens L, D'Orléans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Advances in Pharmacology* 2016; 77:143–75.
28. Jen HL, Yin WH, Chen JW, Lin SJ. Endothelin-1-Induced Cell Hypertrophy in Cardiomyocytes is Improved by Fenofibrate: Possible Roles of Adiponectin. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2017; 24: 508–17.
29. Briançon-Marjollet A, Monneret D, Henri M, Hazane-Puch F, Pepin J-L, Faure P, et al. Endothelin regulates intermittent hypoxia-induced lipolytic remodelling of adipose tissue and phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *The Journal of Physiology* 2016; 594: 1727–40.
30. Dyukova E, Schreckenber R, Arens C, Sitdikova G, Schlüter KD. The Role of Calcium-Sensing Receptors in Endothelin-1-Dependent Effects on Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes: Possible Contribution to Adaptive Myocardial Hypertrophy. *Journal of Cellular Physiology* 2017; 232: 2508–18.
31. Ratti F, Pulitanò C, Catena M, Paganelli M, Aldrighetti L. Serum levels of endothelin-1 after liver resection as an early predictor of postoperative liver failure. A prospective study. *Hepatology Research* 2016; 46: 529–40.
32. Castellon X, Bogdanova V. Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction. *Aging and disease* 2016; 7: 81–9.
33. Lin CC, Lin WN, Hou WC, Hsiao LD, Yang CM. Endothelin-1 induces VCAM-1 expression-mediated inflammation via receptor tyrosine kinases and Elk/p300 in human tracheal smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2015; 309: L211–25.
34. Schlesinger M, Bendas G. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)-An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *International Journal of Cancer* 2015; 136: 2504–14.
35. Yeager ME, Belchenko DD, Nguyen CM, Colvin KL, Ivy DD, Stenmark KR. Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012; 46: 14–22.
36. Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 1994; 79: 1257–66.
37. Bellisai F, Morozzi G, Scaccia F, Chellini F, Simpatico A, Pecetti G, et al. Evaluation of the Effect of Bosentan Treatment on Proinflammatory Cytokine Serum Levels in Patients

- Affected by Systemic Sclerosis. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2011; 24: 261–4.
38. Chen Y, Hanaoka M, Droma Y, Chen P, Voelkel NF, Kubo K. Endothelin-1 receptor antagonists prevent the development of pulmonary emphysema in rats. *European Respiratory Journal* 2010; 35: 904–12.
39. Li MW, Mian MOR, Barhoumi T, Rehman A, Mann K, Paradis P, et al. Endothelin-1 Overexpression Exacerbates Atherosclerosis and Induces Aortic Aneurysms in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2013; 33: 2306–15.
40. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994; 368: 703–10.
41. McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V, Smith KGC. The immunopathology of ANCA-associated vasculitis. *Seminars in immunopathology* 2014; 36: 461–78.
42. Al-Hussain T, Hussein MH, Conca W, Al Mana H, Akhtar M. Pathophysiology of ANCA-associated Vasculitis. *Advances In Anatomic Pathology* 2017; 24: 226–34.
43. Jarrot P-A, Kaplanski G. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis: An update. *Autoimmunity Reviews* 2016; 15: 704–13.
44. Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nature Reviews Rheumatology* 2014; 10: 463–73.
45. Yates M, Watts R. ANCA-associated vasculitis. *Clinical medicine (London, England)* 2017; 17: 60–4.
46. Hauschild S, Schmitt WH, Csernok E, Flesch BK, Rautmann A, Gross WL. ANCA in Systemic Vasculitides, Collagen Vascular Diseases, Rheumatic Disorders and Inflammatory Bowel Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1993; 336: 245–51.
47. de Lind van Wijngaarden RAF, van Rijn L, Hagen EC, Watts RA, Gregorini G, Tervaert JWC, et al. Hypotheses on the Etiology of Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody Associated Vasculitis: The Cause Is Hidden, but the Result Is Known. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2008; 3: 237–52.
48. Watts RA, Robson J. Introduction, epidemiology and classification of vasculitis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2018; 32: 3–20.
49. Russo AJ, Krigsman A, Jepson B, Wakefield A. Low Serum Alpha-Antitrypsin Associated with Anti-PR-3 ANCA in Autistic Children with GI Disease. *Genomics insights* 2009; 2: 1–9.

50. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology* 2015; 25: 639–50.
51. Patry YC, Trewick DC, Gregoire M, Audrain MAP, Moreau AMN, Muller J, et al. Rats Injected with Syngenic Rat Apoptotic Neutrophils Develop Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Journal of the American Society of Nephrology* 2001; 12: 1764–8.
52. Söderberg D, Segelmark M. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Frontiers in immunology* 2016; 7: 256.
53. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Frontiers in immunology* 2016; 7: 302.
54. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11: 519–31.
55. Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, Holle JU, Watts RA, Jayne DRW, et al. Genetically Distinct Subsets within ANCA-Associated Vasculitis. *New England Journal of Medicine* 2012; 367: 214–23.
56. Watts RA. Should proteinase-3 and myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody vasculitis be treated differently: part 1. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2019; 34: 381–3.
57. Yang JJ, Pendergraft WF, Alcorta DA, Nachman PH, Hogan SL, Thomas RP, et al. Circumvention of Normal Constraints on Granule Protein Gene Expression in Peripheral Blood Neutrophils and Monocytes of Patients with Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15: 2103–14.
58. Xiao H, Hu P, Falk RJ, Jennette JC. Overview of the Pathogenesis of ANCA-Associated Vasculitis. *Kidney diseases (Basel, Switzerland)* 2016; 1: 205–15.
59. von Borstel A, Sanders JS, Rutgers A, Stegeman CA, Heeringa P, Abdulahad WH. Cellular immune regulation in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Autoimmunity Reviews* 2018; 17: 413–21.
60. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and—yet—unanswered questions. *Autoimmunity Reviews* 2015; 14: 105–16.
61. Nogueira E, Hamour S, Sawant D, Henderson S, Mansfield N, Chavele KM, et al. Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010; 25: 2209–17.

62. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, Knippenberg S, Hilhorst M, van Paassen P, et al. Regulatory B cells in ANCA-associated vasculitis. *Annals of the rheumatic diseases* 2013; 72: 1416–9.
63. Gómez-Puerta JA, Gedmintas L, Costenbader KH. The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: systematic review and meta-analysis. *Autoimmunity reviews* 2013; 12: 1129–35.
64. Radić M, Martinović Kaliterna D, Radić J. Drug-induced vasculitis: a clinical and pathological review. *The Netherlands journal of medicine* 2012; 70: 12–7.
65. Nakazawa D, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nature Reviews Rheumatology* 2019; 15: 91–101.
66. Roth AJ, Ooi JD, Hess JJ, van Timmeren MM, Berg EA, Poulton CE, et al. Epitope specificity determines pathogenicity and detectability in ANCA-associated vasculitis. *The Journal of clinical investigation* 2013; 123: 1773–83.
67. Peakman M, Vergani D. Innate immunity II: cellular mechanisms. In: *Basic and Clinical Immunology*. Churchill Livingstone, 2009: 23-30.
68. Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical Care* 2016; 20: 73.
69. Jennette JC, Xiao H, Falk R, Gasim AMH. Experimental models of vasculitis and glomerulonephritis induced by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Contributions to nephrology* 2011; 169: 211–20.
70. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *The American journal of pathology* 2007; 170: 52–64.
71. Kovalevska M., Kubiliūtė D. Wegenerio granulomatozė. Klinikinis atvejis. *Sveikatos mokslai* 2018; 28: 60–5.
72. Jayne DRW, Bruchfeld AN, Harper L, Schaier M, Venning MC, Hamilton P, et al. Randomized Trial of C5a Receptor Inhibitor Avacopan in ANCA-Associated Vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2017; 28: 2756–67.
73. Zhang J, Alcaide P, Liu L, Sun J, He A, Luscinskas FW, et al. Regulation of Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression by Mast Cells, Macrophages, and Neutrophils. *PLoS ONE* 2011; 6: e14525.
74. Carman C V. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by ‘invadosome-like protrusions’. *Journal of Cell Science* 2009; 122: 3025–35.
75. Halbwachs L, Lesavre P. Endothelium-neutrophil interactions in ANCA-associated diseases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012; 23: 1449–61.

76. Miao D, Li DY, Chen M, Zhao MH. Platelets are activated in ANCA-associated vasculitis via thrombin-PARs pathway and can activate the alternative complement pathway. *Arthritis Research & Therapy* 2017; 19: 252.
77. Brunini F, Page TH, Gallieni M, Pusey CD. The role of monocytes in ANCA-associated vasculitides. *Autoimmunity Reviews* 2016; 15: 1046–53.
78. Salazar J, Martínez MS, Chávez-Castillo M, Núñez V, Añez R, Torres Y, et al. C-Reactive Protein: An In-Depth Look into Structure, Function, and Regulation. *International Scholarly Research Notices* 2014; 2014: 1–11.
79. Del Giudice M, Gangestad SW. Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain, Behavior, and Immunity* 2018; 70: 61–75.
80. Liu M, Liang T, Zhang P, Zhang Q, Lu L, Wang Z. hsCRP and ET-1 expressions in patients with no-reflow phenomenon after Percutaneous Coronary Intervention. *Pakistan journal of medical sciences* 2017; 33: 920–5.
81. Bray C, Bell LN, Liang H, Haykal R, Kaiksow F, Mazza JJ, et al. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine. *WMJ* 2016; 115: 317–21.
82. Csernok E, Bossuyt X. Investigations in systemic vasculitis. The role of the laboratory. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2018; 32: 52–62.
83. Kidder D, Dospinescu P, Karabayas M, Basu N. Systemic vasculitides: an overview. *Medicine* 2018; 46: 93–7.
84. Pearson LJ, Yandle TG, Nicholls MG, Evans JJ. Regulation of endothelin-1 release from human endothelial cells by sex steroids and angiotensin-II. *Peptides* 2008; 29: 1057–61.
85. Wilbert-Lampen U, Seliger C, Trapp A, Straube F, Plasse A. Female Sex Hormones Decrease Constitutive Endothelin-1 Release via Endothelial Sigma-1/Cocaine Receptors: An Action Independent of the Steroid Hormone Receptors. *Endothelium* 2005; 12: 185–91.
86. Bilsel A, Moini H, Tetik E, Aksungar F, Kaynak B, Özer A. 17 β -Estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovascular Research* 2000; 46: 579–84.
87. Česnovaitė V, Mačiulaitienė E. Pomenopauzinio amžiaus moterų požiūris į hormoninius ir alternatyvius klimakso simptomų gydymo metodus. In: *Lietuvos Sveikatos Mokslų Studentų Ir Jaunujų Tyrėjų Konferencija, Kaunas, 2005: tezės*, p. 19.
88. Rupšytė L, Varžgalienė Laima, Varžgalis M. Moterų požiūris į pakaitinę hormonų terapiją (PHT) bei jį įtakojantys veiksniai. *Lietuvos Sveikatos Mokslų Studentų Ir Jaunujų Tyrėjų*

Konferencija, Kaunas, 2005: tezės, p. 14.

89. Abcam. Direct vs indirect immunofluorescence. Prieiga: <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>.
90. ImmcoDiagnostics. ImmuGlo™ ANCA Assay ImmuLisa™ ANCA Screen, MPO, PR3 Assays. Prieiga: www.immco.com.
91. Biomedica Medizinprodukte GmbH. Endothelin (1-21) ELISA Kit (BI-20052) reagentų aprašas. Prieiga: <https://www.labome.com/product/Biomedica-Gruppe/BI-20052.html>.
92. VULSK. LMC Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijos normos, 2019 01 14 atnaujinimas. Prieiga: http://www.santa.lt/index.php?option=com_content&view=article&id=392&Itemid=387.
93. VULSK. LMC Biochemijos laboratorijos normos, 2019 01 02 atnaujinimas. http://www.santa.lt/index.php?option=com_content&view=article&id=392&Itemid=387.
94. Donato AJ, Gano LB, Eskurza I, Silver AE, Gates PE, Jablonski K, et al. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2009; 297: H425–32.
95. Maeda S, Tanabe T, Miyauchi T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, et al. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *Journal of Applied Physiology* 2003; 95: 336–41.
96. Gorski S, Bartnicka M, Citko A, Żelazowska-Rutkowska B, Jablonski K, Gorska A, et al. Microangiopathy in Naifold Videocapillaroscopy and Its Relations to sE- Selectin, Endothelin-1, and hsCRP as Putative Endothelium Dysfunction Markers among Adolescents with Raynaud’s Phenomenon. *Journal of Clinical Medicine* 2019; 8: 567.
97. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. *Clinical Rheumatology* 2005; 24: 111–6.
98. Laczik R, Soltesz P, Szodoray P, Szekanecz Z, Kerekes G, Paragh G, et al. Impaired endothelial function in patients with undifferentiated connective tissue disease: a follow-up study. *Rheumatology* 2014; 53: 2035–43.
99. Rychlik-Golema W, Mastej K, Adamiec, Angiology. The Role of Endothelin-1 and Selected Cytokines in the Pathogenesis. *International Angiology* 2006; 25: 221-7.
100. Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Webb RC, et al. Endothelin, sex and hypertension. *Clinical Science* 2008; 114: 85–97.
101. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunology* 2001; 2: 777–80.

102. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2012; 11: A465–70.
103. Buleishvili M, Lobjanidze N, Ormotsadze G, Enukidze M, Machavariani M, Sanikidze T. Estrogen Related Mechanisms of Hypertension in Menopausal Women. *Georgian Medical News* 2016; 6: 45–8.
104. Weiner M, Segelmark M. The clinical presentation and therapy of diseases related to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity Reviews* 2016; 15: 978–82.
105. Sheldon J. Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2004; 18: 249–69.
106. Miloslavsky EM, Lu N, Unizony S, Choi HK, Merkel PA, Seo P, et al. Myeloperoxidase-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA)-Positive and ANCA-Negative Patients With Granulomatosis With Polyangiitis (Wegener's) Distinct Patient Subsets. *Arthritis & Rheumatology* 2016; 68: 2945–52.
107. Lee Colglazier C, Sutej PG. Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: A Practical Review. *The Southern Medical Journal* 2005; 98: 185–91.
108. Kubaisi B, Abu Samra K, Foster CS. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's disease): An updated review of ocular disease manifestations. *Intractable & rare diseases research* 2016; 5: 61–9.
109. Comarmond C, Cacoub P. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener): Clinical aspects and treatment. *Autoimmunity Reviews* 2014; 13: 1121–5.
110. Litao MKS, Kamat D. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein: How Best to Use Them in Clinical Practice. *Pediatric Annals* 2014; 43: 417–20.
111. Osman R, L'Allier PL, Elgharib N, Tardif JC. Critical appraisal of C-reactive protein throughout the spectrum of cardiovascular disease. *Vascular health and risk management* 2006; 2: 221–37.
112. Gomez Sandoval YH, Emehdi Atef M, Levesque LO, Li Y, B. Anand-Srivastava M. Endothelin-1 Signaling in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Current Vascular Pharmacology* 2014; 12: 202–14.
113. Liu H, Peng Y, Liu F, Liu Y, Ouyang L, Xiao W et al. Correlation between endothelin-1 and atherosclerosis in chronic hemodialysis patients. *Journal of nephrology* 2010; 23: 593–602.
114. Ural AU, Yalcin A, Beyan C, Isimer A, Bayhan H. Plasma Endothelin-1 Concentrations in Patients with Behçet' Disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1994; 23: 322–5.