

ЛОПАТИНА ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

Клинико-иммунологические возможности оценки активности и прогноза локального и генерализованного вариантов гранулематоза Вегенера

14.01.04 – внутренние болезни

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва, 2018

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

Научные руководители:

Доктор медицинских наук

Моисеев Сергей Валентинович

Доктор биологических наук

Мезенцева Марина Владимировна

Официальные оппоненты

Жиляев Евгений Валерьевич - доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, кафедра ревматологии, профессор кафедры;

Бляхер Мария Сергеевна - доктор медицинских наук, профессор, ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, лаборатория по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета, руководитель лаборатории.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки России

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 года, в ___ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.040.13 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор медицинских наук, профессор

Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Гранулематоз Вегенера – это системный васкулит, характеризующийся развитием гранулематозного воспаления и некротизирующего васкулита мелких сосудов с преимущественным поражением верхних дыхательных путей, легких и почек. [Тареев Е.М., 1974, Семенкова Е.Н., 1979, 1984]

В 2012 году в Чапел-Хилл была пересмотрена номенклатура системных васкулитов. [Новиков П.И., 2005] В настоящее время наиболее часто используется новое название нозологической формы заболевания: гранулематоз с полиангиитом (ГПА) вместо гранулематоз Вегенера.

ГПА остается одним из самых тяжелых и прогностически неблагоприятных системных васкулитов [Семенкова Е.Н., 2001; Клименко, 2005]. Наиболее часто заболевание диагностируется у людей в возрасте 64-75 лет. [Buraa Kubaisi, 2016] Заболеваемость ГПА варьируется от 2 до 12 случаев на 1 миллион жителей в год, а распространенность составляет от 23 до 160 случаев на 1 миллион жителей. [Mohammad, 2009] В последние годы отмечается тенденция к увеличению числа больных ГПА, что может отражать не только улучшение долгосрочного прогноза в результате иммуносупрессивной терапии, но и истинный рост заболеваемости [Новиков П.И., 2012, 2015]. Исследование роли цитокинов в развитии иммунопатологического процесса у больных ГПА оправдано с практической точки зрения в связи с возможностью применения генно-инженерных биологических препаратов у данной группы больных. [Мухин Н.А., 2012] Цитокины могут выступать в роли эндогенных маркеров, а определение уровней их синтеза может дать информацию для диагностики нарушений гомеостаза, изучения патогенеза заболеваний, адекватного назначения иммунотерапии. [Симбирцев А.С., 2011] Изучение цитокинов при активности и ремиссии ГПА позволяет определить маркеры, которые могут являться потенциальной мишенью терапевтического воздействия при обострении заболевания. [Бекетова Т.В., 2010; Насонов Е.Л., 1996]. Кроме того, важное значение в настоящее время придается изменению цитокинового спектра при локальной и генерализованной формах заболевания [Müller A., 2000]. Определение генерализованных форм заболевания на ранних этапах с помощью исследования цитокинового профиля может способствовать определению тактики лечения и прогноза заболевания в целом.

Степень разработанности проблемы

В зарубежной литературе приводятся противоречивые данные, касающиеся механизмов развития иммуновоспалительного процесса и методов оценки активности и распространенности

ГПА. [Balding С.Е., 2001; Lúdvíksson В.В., 1998; Abdulahad W.Н., 2008]. Изучение изменения цитокинов только у больных гранулематозом с полиангиитом (Вегенера) не проводилось. В отечественной практике нет работ, посвященных определению дополнительных маркеров обострения и наличия генерализованных форм ГПА, а также изучению взаимосвязи органных поражений и изменения уровней цитокинов.

Цель исследования

Изучить возможности клинико-иммунологической оценки активности и прогноза локального и генерализованного вариантов гранулематоза с полиангиитом (Вегенера).

Задачи исследования

1. Исследовать экспрессию генов и продукцию провоспалительных, противовоспалительных, регуляторных цитокинов у больных с локальной и генерализованной формами ГПА, а также у больных с обострением и ремиссией ГПА.
2. Изучить клинико-иммунологическую связь изменения цитокинов в мононуклеарах периферической крови и сыворотке с наличием признаков васкулита и гранулематозного воспаления, поражением различных органов и тканей у больных ГПА.
3. Оценить возможность использования цитокинов в качестве дополнительных маркеров обострения или наличия генерализованной формы ГПА.
4. Определить факторы риска обострения ГПА в течение одного года на основе изучения цитокинового профиля.

Научная новизна

Впервые в России проводилось исследование цитокинового профиля у больных с различными формами ГПА. В российской выборке выявлено отличие экспрессии генов цитокинов в МПК по сравнению со здоровыми добровольцами. Экспрессия генов цитокинов в МПК у больных с локальной формой ГПА достоверно не отличалась от экспрессии генов цитокинов в МПК больных с генерализованной формой ГПА. Показано значение экспрессии гена ИЛ-18 у больных с обострением ГПА. Исследование сывороточного уровня ИЛ-18 продемонстрировало, что уровень данного цитокина достоверно повышается у больных генерализованной формой ГПА. Исследование сывороточного ИЛ-8 указывает на то, что данный цитокин принимает участие в обострении ГПА. Установлена чувствительность и специфичность определения сывороточного ИЛ-18 как дополнительного показателя наличия генерализованной формы ГПА, а также экспрессии гена ИЛ-18 и продукции ИЛ-8 как дополнительных маркеров активности ГПА. Впервые в России у больных ГПА проводилось

проспективное исследования с целью оценки факторов риска развития обострения ГПА в течение одного года. Показано, что обнаружение ИЛ-1 β в сыворотке крови в диапазоне от 5,1 до 19,7 пг/мл является фактором риска повышения индекса BVAS на 2 и более баллов у больных ГПА в течение одного года. Впервые проводилось исследование взаимосвязи поражения органов и тканей при ГПА с изменением уровня цитокинов. Определена корреляционная связь между наличием критериев гранулематозного воспаления и цитокинов, участвующих в Th1 и Th2 типах иммунного ответа; критериев васкулита и продукцией ИФН- α , ФНО- α , ИЛ-1 β и экспрессией мРНК ИЛ-6.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные указывают на изменения цитокинов, которые приводят к развитию иммуновоспалительного процесса у больных гранулематозом с полиангиитом (Вегенера), а также на участие цитокинов в поражении различных органов при данном заболевании. Изучение маркеров активности и наличия генерализованной формы гранулематоза с полиангиитом (Вегенера) на основе исследования цитокинового профиля позволяет определить мишени терапевтического воздействия, что является перспективным при разработке и внедрении в лечение генно-инженерных биологических препаратов у данной группы больных

Практическая значимость исследования определяется выявлением дополнительных маркеров обострения заболевания, а также наличия генерализованных форм ГПА, на основе исследования цитокинового профиля. В результате нашего исследования показано, что определение мРНК ИЛ-18 в МПК у больных ГПА является и может быть использовано как дополнительный маркер активности заболевания. Выявлено, что ИЛ-18 достоверно чаще повышается у больных генерализованным ГПА, а определение сывороточного ИЛ-18 может быть использовано как дополнительный маркер развития генерализованных форм ГПА. Установлено, что обнаружение сывороточного ИЛ-1 β в диапазоне от 5,1 до 19,7 пг/мл является фактором риска развития обострения ГПА в течение 1 года.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. У больных с локальными и генерализованными формами ГПА наблюдаются сопоставимые изменения экспрессии генов цитокинов в мононуклеарах периферической крови
2. При обострении ГПА по сравнению со здоровыми добровольцами отмечается достоверное повышение экспрессии мРНК ИЛ-18 в мононуклеарах периферической крови
3. Маркером генерализованной формы ГПА является уровень сывороточного ИЛ-18 выше 258,5 пг/мл. Поражение почек в рамках ГПА ассоциировано со снижением экспрессии

мРНК ИФН- α в МПК, а поражение легких - с повышением экспрессии мРНК ИФН- γ , ИЛ-6, ФНО- α в МПК и продукции ИЛ-18.

4. Достоверным фактором риска обострения ГПА в течение 1 года является сывороточный уровень ИЛ-1 β от 5,1 до 19,7 пг/мл, а обострение ГПА ассоциировано с повышением сывороточного уровня ИЛ-8, а

5. Признаки васкулита у больных ГПА коррелируют с повышением продукции ИФН- α и ФНО- α , а признаки гранулематозного воспаления, поражение носа и придаточных пазух - с подавлением экспрессии генов ИЛ-4.

Методология и методы исследования

Теоретической базой проведенной диссертационной работы являлись работы зарубежных авторов, в которых показаны противоречивые данные о механизмах развития иммуновоспалительного процесса и методов оценки активности и распространенности ГПА, а также неполное изучение вопроса изменения цитокинов только у больных с гранулематозом с полиангиитом. В отечественных работах не проводилось изучение цитокинов-маркеров: активности, наличия генерализованной формы заболевания. Отсутствовали данные о цитокинах-предикторах обострения, а также взаимосвязь обнаружения тех или иных цитокинов при поражении определенных органов и систем. Перечисленные обстоятельства стали основой для последующего изучения данной проблемы. Методологической базой является применение методов диагностики: ОТ-ПЦР для определения транскрипции генов цитокинов в МПК и ИФА для определения содержания цитокинов в сыворотке крови больных ГПА. Оценка активности и распространенности заболевания проводилась на основании данных клинической картины заболевания, шкал BVAS и VDI, лабораторно-диагностических методов обследования.

Степень достоверности и апробация результатов

В ходе выполнения данной работы применялось сертифицированное лабораторное оборудование и современные методы обследования пациентов, в результате чего получен значительный объем экспериментальных данных. Анализ полученных данных проводился в соответствии с адекватными общепринятыми методами и критериями статистической обработки. Методы исследования выбраны в соответствии с поставленными целями и задачами. Положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации основаны на результатах исследования, достоверность которых подтверждена актом проверки первичной документации. Апробация работы проведена 15 февраля 2018 года на заседании сотрудников кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и их внедрения в практику.

Внедрение результатов в практику

Результаты используются в работе ревматологического отделений клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева Университетской клинической больницы №3 и кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии медико-профилактического факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Соответствие паспорту научной специальности

Научные положения и результаты исследования соответствуют формуле специальности 14.01.04 – "внутренние болезни" и пунктам: №2, №3 и №5, а также формуле специальности 14.03.09 - "клиническая иммунология, аллергология" и области исследования специальности: изучение патогенеза иммунозависимых заболеваний (иммунодефицитных состояний, аллергической и аутоиммунной патологии), разработка и усовершенствование методов диагностики и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 6 - в зарубежных изданиях. Материалы диссертации представлены на ANCA Workshop (Лондон, 2015 (постерный доклад); Токио, 2017 (2 постерных доклада)), EULAR (Мадрид, 2013 (постерный доклад); Рим, 2015 (постерный доклад))

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 126 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственного исследования, их обсуждения, выводов и практических рекомендаций, содержит 5 рисунков и 28 таблиц. Список литературы содержит 106 источников, из них 37 отечественных.

Клиническое исследование проводилось на базе кафедры внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии медико-профилактического факультета (с 01.04.2018 - кафедра внутренних, профессиональных болезней и ревматологии) в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева УКБ №3 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Минздрава России (Сеченовский Университет) (заведующий кафедрой и директор клиники – доктор медицинских наук - Моисеев С.В.).

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

В исследование включали пациентов с ГПА, установленным в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов 1990 года и номенклатурой, принятой в 2012 году на конференции в Чепел-Хилл (США). Для оценки активности использовали шкалу BVAS (Бермингемский индекс активности васкулита). [Supriah R., 2011] Ремиссией заболевания считалось наличие 1 и менее баллов по шкале BVAS, обострением ГПА - 2 и более баллов по шкале BVAS. У всех больных проводилась оценка органных поражений с использованием индекса VDI. [Exley A.R., 1997] При анализе течения болезни выделяли локальный (поражение верхних дыхательных путей, органа зрения и слуха) и генерализованный (поражение верхних дыхательных путей, органа зрения и слуха в сочетании с поражением легких и/или почек, а также желудочно-кишечного тракта, нервной системы, кожи) варианты ГПА. У всех больных оценивали наличие признаков васкулита и/или гранулематоза. [Watts R., 2007; Новиков П.И., 2014; Бекетова Т.В., 2012]

Определение мРНК 11 цитокинов в мононуклеарах периферической крови (МПК) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) провели у 57 больных ГПА. Выделение РНК проводили по методике [Chomczynski P., Sacchu N., 1987] с использованием набора для выделения научно-производственной компании СИНТОЛ. Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация были выполнены в соответствии с методикой, предложенной С. Gelder. После амплификации продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 1% агарозном геле. В качестве положительного контроля использовали β -актин. Электрофорез кДНК проводили в 1% агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл) в Трис-ацетатном буфере, содержащем 0,2 М ЭДТА. Электрофорез проводился в горизонтальных камерах фирмы «Bio-Rad» 20 минут. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758). [Ершов, 2002]. Группу контроля составляли данные экспрессии мРНК 11 цитокинов в МПК, полученных у 40 здоровых доноров.

Содержание цитокинов в сыворотке крови определяли у 40 больных ГПА. Проводилось исследование ИНФ- α , ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-1 β и ФНО- α с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА). Для количественного определения содержания цитокинов

использовали коммерческие наборы для ИФА ЗАО «Вектор-Бест» по методике, представленной фирмой-производителем.

Статистический анализ.

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica версии 10.0. Учитывая, что результаты исследования с использованием метода ОТ-ПЦР представляют собой качественные показатели, оценку значимости различий в группах проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Для обработки результатов исследования цитокинов с использованием метода ИФА применяли непараметрические методы статистического анализа, а именно критерий Вальда- Вольфовица и критерий Колмогорова-Смирнова. Для расчета показателей диагностической эффективности метода проводилось построение ROC-кривых. Исследование корреляционной связи проводили с использованием непараметрического метода статистического анализа – гамма-корреляции. Для оценки связи между развитием обострения ГПА в течение одного года и наличием фактора риска (изменения цитокинов) проводилось статистическое исследование с применением метода отношения шансов. $P < 0,05$ указывало на статистическую значимость.

Результаты

Клиническая характеристика обследованных больных ГПА

Обследовано 60 больных (21 мужчина и 39 женщин) с установленным диагнозом ГПА. Средний возраст обследованных больных составлял $48,9 \pm 15,6$ лет. Для подтверждения диагноза ГПА у 40 (66,7%) больных была выполнена биопсия. У 22 из 60 больных была выявлена локальная форма ГПА (поражение верхних дыхательных путей, органа слуха и зрения). У 38 больных определялась генерализованная форма ГПА с поражением верхних дыхательных путей, органа зрения, слуха в сочетании с поражением легких и/или почек. Среднее значение BVAS составило 2,7 баллов. Минимальное значение – 0 баллов, максимальное – 18 баллов. У 32 больных определялось 2 и более баллов по шкале BVAS, что расценивалось как обострение заболевания (медиана возрасту – 51,5 лет). Ремиссия ГПА была установлена у 28 больных (медиана возраста – 49,5 лет). Среднее значение индекса VDI составило $11,35 \pm 5,06$. У 46 (76,7%) больных ГПА определялись АНЦА, причем у 36 (60,0%) пациентов были обнаружены АНЦА к протеинезе 3, а у 10 (16,7%) – АНЦА к миелопероксидазе.

Клиническими эквивалентами гранулематозного воспаления у больных ГПА являются: гранулематозное воспаление при биопсии, инфильтраты/узлы в легких, подскладочный стеноз гортани или трахеи, язвенно-некротический ринит с формированием перфорация носовой перегородки, деструктивный синусит, псевдотумор орбиты, утолщение слизистой придаточных пазух носа (длительностью не менее 3 мес.), мастоидит (длительностью не менее 3 мес).

Клиническими признаками васкулита являются кожные геморрагические или язвенно-геморрагические высыпания, эписклерит, множественный мононеврит, гломерулонефрит, протекающий с гематурией, чаще в сочетании с умеренной протеинурией [Watts R., 2007].

Наиболее часто, в 95,0% случаев, у больных ГПА определялось поражение носа и придаточных пазух. Более половины обследованных больных имели поражение легких (58,3%), у 46,7% - наблюдалось поражение почек в рамках васкулита. Признаки васкулита были выявлены у 34 (56,7%) пациентов, признаки гранулематозного воспаления – у 45 (75,0%) больных. Частота поражения органов, развития признаков гранулематозного воспаления и васкулита в зависимости от наличия обострения или ремиссии заболевания, локальной или генерализованной формы ГПА представлена в табл. 1.

Таблица 1 - Поражение органов, наличие признаков гранулематозного воспаления и васкулита у больных с различной формой и периодом заболевания.

	Общее N=60	Форма заболевания		Период заболевания	
		Локальная (n=22)	Генерализованная (n=38)	Обострение (n=32)	Ремиссия (n=28)
VDI	11,35±5,06	7,27±2,62	13, 71±4,68	12,13±5,28	10,46±4,82
Поражение органа зрения	33 (55,0%)	12 (54,5%)	21 (55,3%)	13 (40,6%)	20 (71,4%)
Поражение органа слуха	29 (48,3%)	8 (36,4%)	21 (55,3%)	12 (37,5%)	17 (60,7%)
Поражение носа, придаточных пазух носа	57 (95,0%)	20 (90,9%)	37 (97,4%)	32 (100,0%)	25 (89,3%)
Поражение гортани	16 (26,7%)	7 (31,8%)	9 (23,7%)	8 (25,0%)	8 (28,6%)
Поражение легких	35 (58,3%)	0	35 (92,1%)	22 (68,8%)	13 (46,4%)
Поражение почек	28 (46,7%)	0	28 (73,7%)	14 (43,8%)	14 (50,0%)
Признаки васкулита	34 (56,7%)	3 (13,6%)	31 (81,5%)	19 (59,4%)	15 (53,6%)
Признаки гранулематозного воспаления	45 (75,0%)	19 (86,4%)	26 (68,4%)	29 (90,6%)	16(57,1%)

У больных с обострением ГПА по сравнению с больными, в ремиссии ГПА наиболее часто встречалось повышение содержания СОЭ и С-реактивного белка. Мочевой синдром у

больных ГПА в основном проявлялся гематурией и протеинурией, которые чаще встречались у больных с обострением ГПА. Все пациенты на момент исследования получали иммуносупрессивную терапию, в том числе глюкокортикостероидами – 56 человек (93,3%), из них глюкокортикостероидами более 20 мг/сут – 24 (40%), циклофосфамидом – 24 (40%), метотрексатом – 11 (18,3%), азатиоприном – 9 (15,0%).

Исследование нарушений синтеза цитокинов на уровне транскрипции у больных ГПА

При изучении синтеза цитокинов на уровне транскрипции у 57 больных ГПА выявили статистически значимую ($p < 0,05$) активацию синтеза мРНК ИФН- α , ИЛ-8 и подавление синтеза мРНК ИЛ-12 и ФНО- α по сравнению с группой контроля ($n=40$) (табл.2)

Таблица 2 - Частота выявления мРНК цитокинов у больных ГПА и здоровых добровольцев.

Цитокин	Больные ГПА (n=57)	Контроль (n=40)
	N (%)	N (%)
ИФН- α	23 (40,35)*	1 (2,50)
ИФН- γ	10 (17,54)	12 (30,00)
ИЛ-1 β	27 (47,36)	14 (35,00)
ИЛ-2	8 (14,03)	0
ИЛ-4	3 (5,26)	0
ИЛ-6	17 (29,82)	8 (20,00)
ИЛ-8	25 (43,85)*	4 (10,00)
ИЛ-10	14 (24,56)	8 (20,00)
ИЛ-12	3 (5,26)**	28 (70,00)
ИЛ-18	30 (52,63)	12 (30,00)
ФНО- α	17 (29,82)**	30 (75,00)

Примечание: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (метод Манна-Уитни)

Исследование синтеза цитокинов на уровне транскрипции у больных с локальным и генерализованным ГПА

Статистически достоверная ($p < 0,05$) активация экспрессии генов ИФН- α , ИЛ-8 и подавление экспрессии генов ИЛ-12, ФНО- α определялась у больных с локальной формой ГПА ($n=22$) и генерализованной формой ГПА ($n=35$) по сравнению с группой контроля. При сопоставлении цитокинового профиля у больных локальным ГПА с цитокиновым профилем

больных генерализованным ГПА статистически значимых изменений в экспрессии генов исследуемых цитокинов выявлено не было (табл. 3).

Таблица 3 - Частота выявления мРНК цитокинов у больных с локальным и генерализованным ГПА по сравнению с контролем.

Цитокин	Локальный ГПА (n=22)	Генерализованный ГПА (n=35)	Контроль (n=40)
	N (%)	N (%)	N (%)
ИФН- α	8 (36,36)*	15 (42,85)**	1 (2,50)
ИФН- γ	2 (9,09)	8 (22,85)	12 (30,00)
ИЛ-1 β	11 (50,00)	16 (45,71)	14 (35,00)
ИЛ-2	2 (9,09)	6 (17,14)	0
ИЛ-4	1 (4,54)	2 (5,71)	0
ИЛ-6	4 (18,18)	13 (37,14)	8 (20,00)
ИЛ-8	11 (50,00)**	14 (40,00)*	4 (10,00)
ИЛ-10	7 (31,81)	7 (20,00)	8 (20,00)
ИЛ-12	2 (9,09)***	1 (2,85)***	28 (70,00)
ИЛ-18	12 (54,54)	18 (51,42)	12 (30,00)
ФНО- α	5 (22,72)***	12 (34,28)**	30 (75,00)

Примечание: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (метод Манна-Уитни; сравнение с группой контроля)

Сравнение цитокинового профиля у больных с локальным и генерализованным ГПА с учетом периода течения заболевания. При сопоставлении цитокинового профиля у больных с обострением локального ГПА с цитокиновым профилем больных с ремиссией локального ГПА статистически значимых изменений в экспрессии генов исследуемых цитокинов выявлено не было. Также не было обнаружено достоверных отличий в экспрессии генов исследуемых цитокинов у больных с обострением генерализованного ГПА с цитокиновым профилем больных с ремиссией генерализованного ГПА.

Исследование синтеза цитокинов на уровне транскрипции у больных с обострением и ремиссией ГПА

При анализе цитокинового профиля больных с обострением и ремиссией ГПА было установлено, что при сравнении этих групп с группой контроля определяется активация экспрессии генов ИФН- α , ИЛ-8 и подавление экспрессии генов ИЛ-12, ФНО- α . Кроме того, у больных с обострением ГПА отмечается статистически значимая активация экспрессии гена ИЛ-18 по сравнению с группой контроля. При сопоставлении цитокинового профиля у больных

с обострением ГПА с цитокиновым профилем больных с ремиссией ГПА статистически значимых изменений в экспрессии генов исследуемых цитокинов выявлено не было (табл. 4).

Таблица 4 - Частота выявления мРНК цитокинов у больных с обострением и ремиссией ГПА и здоровыми добровольцами.

Цитокин	Обострение ГПА (n=29)	Ремиссия ГПА (n=28)	Контроль (n=40)
	N (%)	N (%)	N (%)
ИФН- α	14 (48,27)**	9 (32,14)*	1 (2,50)
ИФН- γ	5 (17,24)	5 (17,85)	12 (30,00)
ИЛ-1 β	13 (44,82)	14 (50,00)	14 (35,00)
ИЛ-2	4 (13,79)	4 (14,28)	0
ИЛ-4	1 (3,44)	2 (7,14)	0
ИЛ-6	9 (31,03)	8 (28,57)	8 (20,00)
ИЛ-8	14 (48,27)**	11 (39,28)*	4 (10,00)
ИЛ-10	7 (24,13)	7 (25,00)	8 (20,00)
ИЛ-12	2 (6,89)***	1 (3,57)***	28 (70,00)
ИЛ-18	19 (65,51)*	11 (39,28)	12 (30,00)
ФНО- α	10 (34,48)**	7 (25,00)***	30 (75,00)

* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,001$ (метод Манна-Уитни; сравнение с группой контроля)

Для определения возможности использовать мРНК ИЛ-18 в качестве дополнительного показателя активности ГПА, определена специфичность и чувствительность данного метода. Проведен ROC-анализ (рис. 1).

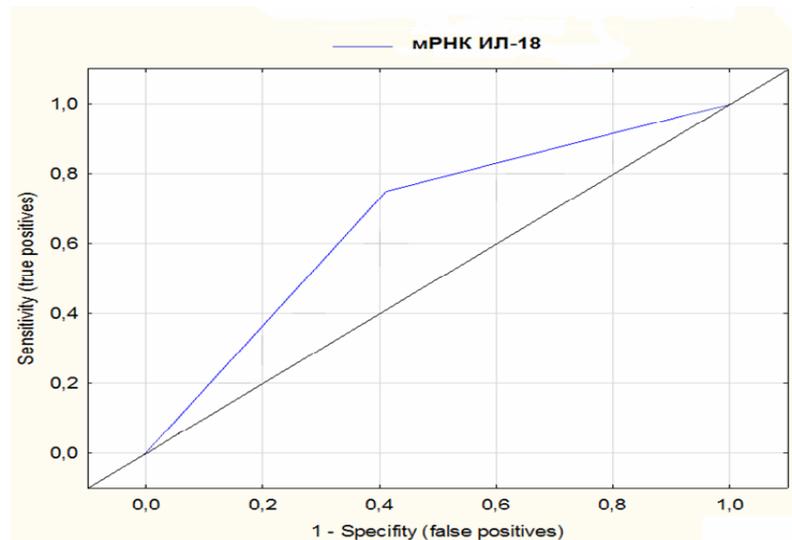


Рисунок 1 - Чувствительность и специфичность определения мРНК ИЛ-18 в МПК у больных с обострением ГПА (ROC-анализ).

Площадь под кривой составила 0,67. Проведенный ROC-анализ продемонстрировал, что чувствительность данного метода составляет -75%, специфичность - 41%.

Сравнение цитокинового профиля у больных с обострением и ремиссией ГПА с учетом формы заболевания. При сопоставлении цитокинового профиля у больных с обострением локального ГПА с цитокиновым профилем больных с обострением генерализованного ГПА статистически значимых изменений в экспрессии генов исследуемых цитокинов выявлено не было. Также не было определено достоверных отличий в экспрессии генов исследуемых цитокинов у больных с ремиссией локального ГПА с цитокиновым профилем больных с ремиссией генерализованного ГПА.

Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови больных ГПА

У 40 из 60 больных ГПА проводилось исследование содержания ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18 и ФНО- α в сыворотке крови. При сравнении концентрации цитокинов больных ГПА с нормальными значениями, указанными фирмой-производителем, установлено, что у обследованных больных в сыворотке крови наиболее часто выявлялось повышенное содержание ИЛ-1 β (50%) и ИЛ-18 (45%), реже – ФНО- α (15%) и ИФН- α (17,5%). ИЛ-8 определяется в повышенных концентрациях у 35% больных ГПА.

При изучении продукции цитокинов больных ГПА обнаружено, что уровни всех изучаемых цитокинов (ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18, ФНО- α) в сыворотке крови были выше у пациентов с обострением ГПА, чем у пациентов с ремиссией заболевания, однако статистически значимая разница была выявлена для ИЛ-8. У больных с обострением ГПА в сыворотке крови

достоверно чаще ($p < 0,01$) определялось повышение содержания ИЛ-8 по сравнению с больными в ремиссии заболевания (табл. 5, рис. 2).

Таблица 5 - Сравнение средних значений содержания цитокинов в сыворотке крови у больных с обострением и ремиссией ГПА.

Цитокин	Обострение ГПА (n=23), пг/мл	Ремиссия ГПА (n=17), пг/мл
ИФН- α	11,03 \pm 12,14	7,63 \pm 10,84
ИЛ-1 β	74,84 \pm 104,01	36,54 \pm 61,53
ИЛ-8	18,53 \pm 42,20*	8,24 \pm 4,22*
ИЛ-18	359,24 \pm 293,66	303,86 \pm 241,52
ФНО- α	11,20 \pm 23,50	1,00 \pm 0,00

* $p < 0,05$ (метод Вальда-Вольфовитца)

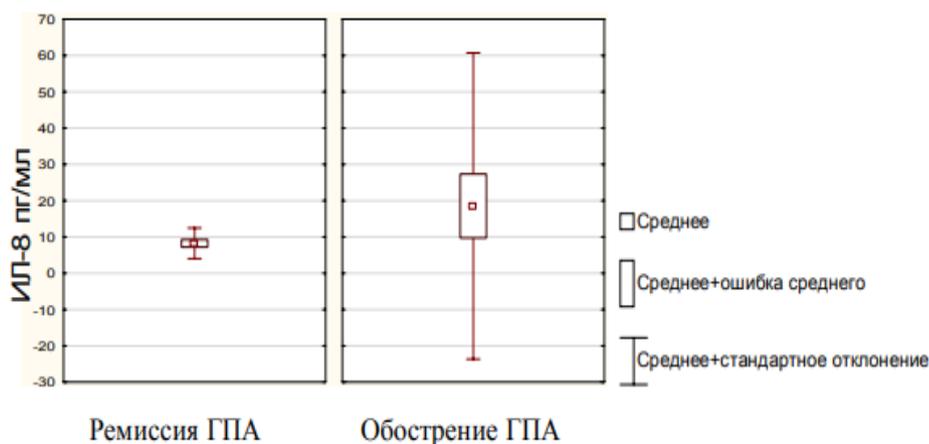


Рис. 2 - Уровень ИЛ-8 в сыворотке крови у больных с ремиссией и обострением ГПА.

Для определения возможности использования ИЛ-8 в качестве дополнительного показателя активности ГПА, была определена специфичность и чувствительность данного метода. Проведен ROC анализ. Определены оптимальные значения чувствительности и специфичности, которые составляют 65,2 и 64,7% соответственно при концентрации ИЛ-8 в сыворотке крови более 6,3 пг/мл. Площадь под ROC-кривой составляет 0,54. (рис. 3).

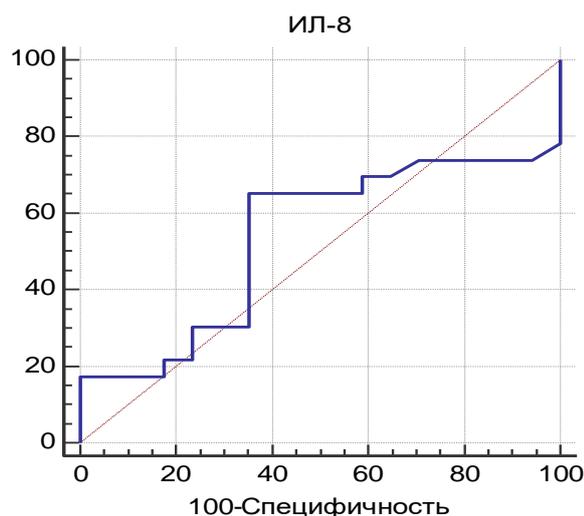


Рисунок 3 - Чувствительность и специфичность определения ИЛ-8 в сыворотке крови у больных с обострением ГПА (ROC - анализ)

Оценка продукции цитокинов у больных локальной и генерализованной формами ГПА

При сравнении средних значений содержания цитокинов в сыворотке крови больных с локальной и генерализованной формами заболевания, отмечено, что уровни всех изучаемых цитокинов (ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18, ФНО- α) в сыворотке крови были выше у пациентов с генерализованной формой ГПА, чем у пациентов с локальным ГПА, однако статистически значимая разница была выявлена для интерлейкина-18 (табл. 6). У больных с генерализованной формой заболевания уровень ИЛ-18 достоверно выше ($p < 0,05$), чем у больных с локальной формой заболевания (рис. 4).

Таблица 6 - Сравнение средних значений содержания цитокинов в сыворотке крови у больных с локальным и генерализованным ГПА.

Цитокин	Локальный ГПА (n=17), пг/мл	Генерализованный ГПА (n=23), пг/мл
ИФН- α	8,08 \pm 6,87	10,7 \pm 14,16
ИЛ-1 β	49,22 \pm 77,20	65,47 \pm 98,85
ИЛ-8	8,08 \pm 3,79	18,64 \pm 42,20
ИЛ-18	237,75\pm142,75 **	408,09\pm319,86 **
ФНО- α	1,24 \pm 0,99	11,02 \pm 23,56

** ($p < 0,05$) (метод Колмогорова-Смирнова).

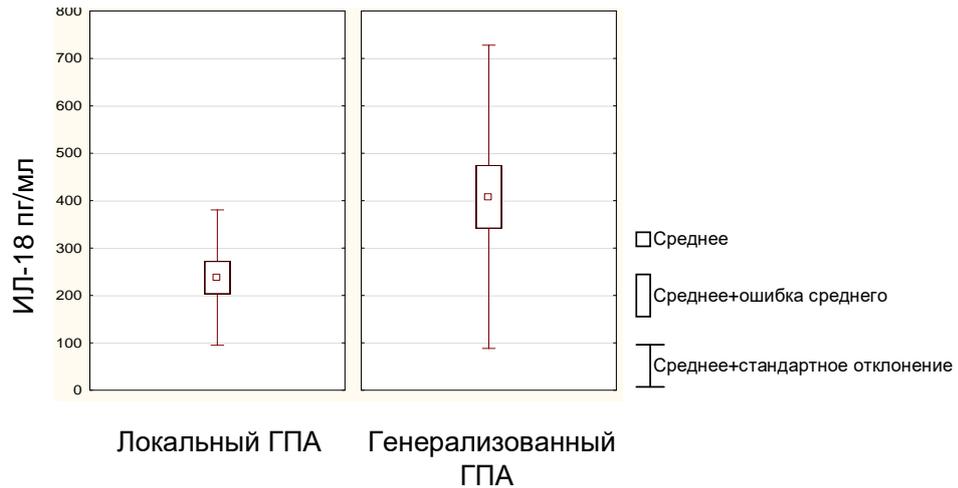


Рисунок 4 - Уровень ИЛ-18 в сыворотке крови у больных с локальным и генерализованным ГПА.

Для оценки чувствительности и специфичности определения ИЛ-18 методом ИФА, как дополнительного показателя генерализованной формы ГПА, проведен ROC-анализ. Наиболее оптимальные значения чувствительности и специфичности, которые составляют 60,9 и 82,4% соответственно, установлены при концентрации данного биомаркера в сыворотке крови больных ГПА более 258,5 пг/мл. Площадь под ROC-кривой составляет 0,627 (рис. 5).

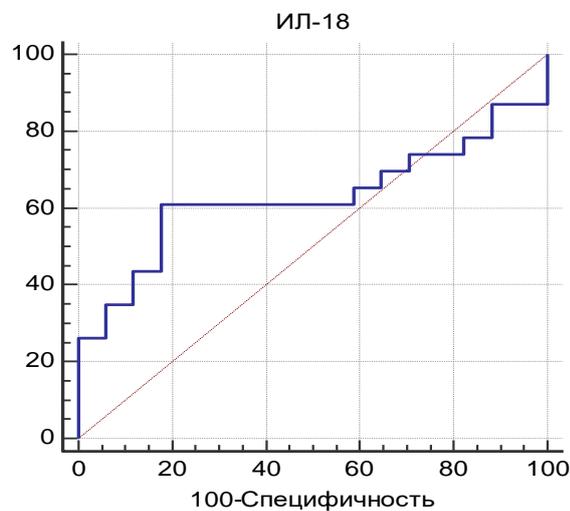


Рисунок 5 - Чувствительность и специфичность определения ИЛ-18 в сыворотки крови у больных с генерализованной формой ГПА (ROC-анализ)

Корреляция между клинико-лабораторными данными и цитокинами у больных ГПА

Проводилось исследование корреляционной зависимости обнаружения экспрессии мРНК ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- α , определяемых методом ПЦР, и уровнями ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18 и ФНО- α в сыворотке крови,

определяемых методом ИФА, с клинико-лабораторными проявлениями болезни: поражением органа зрения; органа слуха; носа и придаточных пазух носа; гортани; легких, почек, а также с наличием критериев васкулита и гранулематозного воспаления. Результаты исследования корреляционных связей между клинико-лабораторными проявлениями ГПА и цитокинами представлены в таб. 7.

Таблица 7 - Коэффициенты корреляции (R) между клинико-лабораторными данными с одной стороны и уровнем экспрессии мРНК цитокинов в МПК и содержанием цитокинов в сыворотке с другой стороны у больных ГПА.

	Признаки васкулита	Признаки гранулематозного поражения	Поражение носа и ППН	Поражение органа слуха	Поражение глаз	Поражение гортань	Поражение легких	Поражение почки
Транскрипция цитокинов								
ИФН- α	0,17	0,01	0,16	-0,33	-0,08	-0,20	0,30	-0,36*
ИФН- γ	0,28	-0,37	1,00	0,02	0,38	-1,00*	0,57*	0,11
ИЛ-1 β	0,23	0,02	-0,40	0,24	0,05	-0,02	0,12	0,10
ИЛ-2	0,27	0,04	-0,54	0,31	-0,10	-0,47	0,45	0,38
ИЛ-4	0,55	-0,73*	-0,86*	-0,33	1,00*	-1,00	0,23	0,43
ИЛ-6	0,40	-0,11	-0,09	0,11	0,13	-0,57*	0,41*	0,36
ИЛ-8	0,20	-0,08	0,23	-0,32	0,20	0,25	-0,01	-0,20
ИЛ-10	-0,08	-0,48*	1,00	0,39	-0,30	0,08	-0,16	-0,07
ИЛ-12	-0,12	-0,17	-0,86*	-1,00*	1,00*	-1,00	-0,46	-0,27
ИЛ-18	0,35	0,63*	0,40	0,17	-0,19	-0,33	0,16	0,05
ФНО- α	0,25	-0,31	1,00	-0,06	-0,04	-0,33	0,41*	0,04
Продукция цитокинов								
ИФН- α	0,74*	1,00	-0,68*	-0,05	0,13	0,01	0,11	0,10
ИЛ-1 β	0,17	0,02	-0,11	-0,07	0,05	-0,26	-0,01	0,05
ИЛ-8	0,22	-0,11	0,01	-0,14	0,19	-0,33	0,07	0,24
ИЛ-18	0,22	-0,29	-0,03	-0,34*	0,40*	-0,55*	0,32*	0,17
ФНО- α	0,66*	1,00	1,00	0,00	0,11	0,04	0,43	0,29

* $p < 0,05$ (метод гамма корреляции)

По данным проведенного исследования обнаружено, что наличие признаков васкулита достоверно коррелировало с повышением уровня ИФН- α ($r=0,74$) и ФНО- α ($r=0,66$) в сыворотке крови больных ГПА. Выявление признаков гранулематозного поражения имело статистически значимую прямую корреляционную зависимость с обнаружением мРНК ИЛ-18 ($r=0,63$) и

обратную корреляционную связь с обнаружением мРНК ИЛ-4 ($r = -0,73$) и обнаружением мРНК ИЛ-10 ($r = -0,48$) в МПК.

При поражении носа и придаточных пазух носа были установлены достоверные обратные корреляционные зависимости с наличием экспрессии мРНК ИЛ-4 и мРНК ИЛ-12 ($r = -0,86$), а также с понижением уровня ИФН- α в сыворотки крови ($r = -0,68$). При поражении органа слуха у больных ГПА отмечалась статистически значимая полная обратная корреляционная зависимость с экспрессией мРНК ИЛ-12 ($r = -1,00$), а также отрицательная связь с уровнем продукции ИЛ-18 в сыворотки крови ($r = -0,34$). Поражение органа зрения было достоверно ассоциировано с обнаружением экспрессии мРНК ИЛ-4, ИЛ-12 ($r = 1,00$) и повышением уровня ИЛ-18 в сыворотке крови ($r = 0,40$). При поражении гортани у больных ГПА были установлены статистически значимые обратные корреляционные зависимости с наличием экспрессии ИФН- γ ($r = -1,00$), ИЛ-6 ($r = -0,57$), и уровнем продукции ИЛ-18 ($r = -0,55$).

При генерализованной форме ГПА с вовлечением легких отмечались достоверные корреляционные связи с обнаружением экспрессии мРНК ИФН- γ ($r = 0,57$), ИЛ-6 ($r = 0,41$) и ФНО- α ($r = 0,41$), а также статистически значимая прямая корреляция с повышением уровня ИЛ-18 в сыворотки крови ($r = 0,32$). Поражение почек у больных ГПА ассоциировано с обнаружением достоверных обратных корреляционных зависимостей с наличием экспрессии мРНК ИФН- α ($r = -0,36$).

Помимо исследования корреляционных связей изменения цитокинов при поражении различных органов и систем, проводилось исследование корреляционных зависимостей изменения цитокинов с изменением различных лабораторных показателей. Установлено, что повышение уровня креатинина выше нормы имело достоверную прямую корреляцию с обнаружением экспрессией мРНК ИФН-гамма ($0,53$), ИЛ-6 ($0,41$) и ИЛ-12 ($0,7$) в мононукларах периферической крови. Обнаружение протеинурии у больных ГПА с поражением почек имело прямую достоверную корреляцию с сывороточными уровнями ИЛ-8 ($r = 0,52$) и ИЛ-18 ($r = 0,33$). При более активном течении гломерулонефрита (протеинурии более $0,5$ г/сут) помимо ИЛ-8 ($r = 0,48$) и ИЛ-18 ($r = 0,53$) определялась достоверная прямая корреляционная связь с сывороточным уровнем ИЛ-1 β ($r = 0,47$). Проводилось также исследование корреляционных зависимостей между уровнями экспрессии и продукции цитокинов и наличием гематурии у больных генерализованным ГПА с поражением почек. Достоверных корреляционных связей обнаружено не было.

Проводилось исследование корреляционных связей с наличием АНЦА. У 46 (76,7%) больных ГПА определялись АНЦА. Определена достоверная прямая корреляционная

зависимость между наличием АНЦА и обнаружением мРНК ИЛ-18 (0,48), а также достоверная обратная корреляционная связь между наличием АНЦА и обнаружением мРНК ИФН-альфа (-0,43). Повышение уровня С-реактивного белка выше нормы имело достоверную прямую корреляцию с обнаружением экспрессией мРНК ИЛ-4 (0,71), ИЛ-8 (0,51), ИЛ-18 (0,65) и ФНО-альфа (0,63).

Факторы риска развития обострения ГПА в течение одного года.

У 42 из 60 обследованных нами больных ГПА (14 мужчин и 28 женщин, в возрасте от 18 до 77 лет) проводилось наблюдение в динамике. Минимальный срок наблюдения составил 10 месяцев, максимальный срок наблюдения - 18 месяцев. У всех обследованных больных выполнялась оценка активности васкулита с использованием шкалы BVAS. Среднее значение индекса BVAS на момент первичного обследования составляло 2,7 баллов. Нарастание индекса на 2 балла по сравнению с данными предыдущей госпитализации расценивалось как нарастание активности ГПА.

У 30 из 42 пациентов отсутствовали данные за наличие отрицательной динамики по сравнению с предыдущей госпитализацией. У 12 человек определялось повышение индекса BVAS на 2 и более баллов по сравнению с предыдущим обследованием.

В течение всего периода наблюдения все пациенты получали иммуносупрессивную терапию, в том числе глюкокортикостероидами – 40 (95,2%) человек, из них глюкокортикостероидами более 20 мг/сут – 17 (40,5%) , циклофосфамидом –18 (42,9%) , метотрексатом – 4 (9,5%), азатиоприном – 9 (21,4%), микофенолатом мофетилом - 1 (2,4%), ГИБТ (ритуксимаб) - 1 (2,4%).

Определение факторов риска при исследовании транскрипции генов цитокинов

Всем 42 больным, включенным в динамический контроль при первичном обследовании проводилось исследование транскрипции цитокинов методом ОТ-ПЦР. При обследовании больных через год, у 12 человек было выявлено нарастание индекса BVAS на 2 балла и более, у 30 указанного повышения индекса BVAS не определялось.

Выполнен статистический анализ с использованием метода отношения шансов. (табл. 8). Обнаружение экспрессии мРНК цитокинов у больных ГПА расценивалось как наличие фактора риска, отсутствие экспрессии мРНК цитокина - как отсутствие фактора риска.

Таблица 8 - Определение факторов риска повышение индекса BVAS на 2 балла и более в течение года у больных ГПА при оценке транскрипции цитокинов.

Цитокины	Отношение шансов (95% ДИ)	P
Транскрипция цитокинов (N=42)		
ИФН- α	1.17(0.28-4.89)	0.83
ИФН- γ	1.00(0.17-6.03)	1.00
ИЛ-1 β	0.50(0.12-2.02)	0.33
ИЛ-2	1.8(0.26-12.41)	0.55
ИЛ-4	0.79(0.03-20.66)	0.89
ИЛ-6	0.47(0.09-2.57)	0.38
ИЛ-8	0.38(0.09-1.69)	0.20
ИЛ-10	0.80(0.14-4.66)	0.80
ИЛ-12	0.79(0.03-20.66)	0.89
ИЛ-18	0.44(0.11-1.77)	0.25
ФНО- α	0.21(0.02-1.90)	0.17

Установлено, что обнаружение транскрипции генов изученных цитокинов не является фактором риска повышение индекса BVAS на 2 и более баллов в течение года у больных ГПА.

Определение факторов риска при исследовании продукции цитокинов

Проводилось изучение факторов риска нарастания индекса BVAS на 2 и более баллов у больных ГПА при исследовании содержания цитокинов в сыворотке крови с использование метода ИФА.

У 28 из 42 больных ГПА, при первичном обследовании, проведен иммуноферментный анализ (ИФА) с целью оценки содержания цитокинов в сыворотки крови. При динамическом обследовании, из 28 больных, у 9 выявлено нарастание индекса BVAS на 2 балла и более, у 19 - указанного повышение индекса BVAS не определялось.

Проводилось определение среднего содержания цитокинов в сыворотке крови, а также значения межквартильного размаха у больных с наличием и отсутствием отрицательной динамики ГПА (табл. 9).

Обнаружение значения цитокина в пределах межквартильного размаха, определяемого у больных с отрицательной динамикой ГПА, расценивалось как наличие фактора риска, обнаружение цитокинов вне пределов межквартильного размаха - как отсутствие фактора риска. Выполнен статистический анализ с использованием метода отношения шансов. (таб. 28)

Таблица 9 - Определение факторов риска повышение индекса BVAS на 2 балла и более в течение года у больных ГПА при оценке содержания цитокинов в сыворотке крови).

Цитокины	Отношение шансов (95% ДИ)	P
Продукция цитокинов (N=28)		
ИФН- α	9.14(0.46-182.62)	0,15
ИЛ-1 β	6.67(1.10-40.44)*	0,04*
ИЛ-8	2.22(0.43-11.60)	0.34
ИЛ-18	3.15(0.52-19.27)	0.21
ФНО- α	7.21(0.36-145.99)	0,20

* P < 0,05 (метод отношения шансов)

Достоверным фактором риска повышения индекса BVAS на 2 и более баллов у больных ГПА в течение одного года является обнаружение ИЛ-1 β в сыворотке крови в пределах от 5,1 до 19,7 пг/мл.

Выводы:

1. Экспрессия мРНК цитокинов в МПК больных с локальной формой ГПА не отличается от таковой у больных с генерализованной формой ГПА и характеризуется увеличением экспрессии ИФН- α , ИЛ-8 и снижением экспрессии ФНО- α и ИЛ-12 по сравнению со здоровыми добровольцами.
2. Цитокиновый профиль в МПК больных с обострением и ремиссией ГПА идентичен цитокиновому профилю больных с локальной и генерализованной формами заболевания, однако при обострении ГПА по сравнению со здоровыми добровольцами отмечается достоверное повышение экспрессии мРНК ИЛ-18, который является маркером активности заболевания.
3. Поражение почек у больных ГПА имеет достоверную обратную корреляцию с экспрессией мРНК ИФН- α , поражение легких - прямую корреляционную связь с экспрессией мРНК ИФН- γ , ИЛ-6, ФНО- α в МПК и продукцией ИЛ-18. Содержание ИЛ-18 более 258,5 пг/мл в сыворотке крови больных ГПА является маркером генерализованной формы заболевания.
4. У больных ГПА достоверным фактором риска нарастания активности в течение 1 года является сывороточный уровень ИЛ-1 β в диапазоне от 5,1 до 19,7 пг/мл, а обострение заболевания ассоциировано с повышением сывороточного уровня ИЛ-8.
5. Достоверные прямые корреляционные зависимости обнаружены между наличием признаков васкулита и продукцией ИФН- α , ФНО- α ; поражением органа зрения и экспрессией мРНК ИЛ-4, ИЛ-12 и продукцией ИЛ-18; обратные корреляционные связи - между наличием признаков

гранулематозного воспаления, поражением носа, придаточных пазух и экспрессией мРНК ИЛ-4; поражением органа слуха и экспрессией мРНК ИЛ-12, продукцией ИЛ-18.

Практические рекомендации

1. Обнаружение сывороточной концентрации ИЛ-1 β в диапазоне от 5,1 до 19,7 пг/мл указывает на вероятность повышения индекса BVAS на 2 и более баллов в течение ближайшего года у больных ГПА.
2. Определение мРНК ИЛ-18 в мононуклеарах периферической крови целесообразно для дополнительного определения активности заболевания.
3. Исследование сывороточного уровня ИЛ-18 у больных ГПА возможно использовать как дополнительный маркер наличия генерализованной формы ГПА.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мухин Н.А., Новиков П.И., Моисеев С.В., Семенкова Е.Н., Козловская Л.В., Фомин В.В., Игнатова Т.М., Стрижаков Л.А., Гуляев С.В., Янушкевич Т.Н., Краснова Т.Н., Никифорова Н.В., Мешков А.Д., Панасюк В.В., Рошупкина С.В., Сорокин Ю.Д., Парфенова С.А., Дубровская Л.В., Жабина Е.С., Кузнецова Е.И., **Лопатина И.А.** Эффективность и безопасность генно-инженерных биологических препаратов у пациентов с ревматоидным артритом и другими ревматическими заболеваниями (проспективное неконтролируемое исследование) // **Клиническая фармакология и терапия.**- 2013.- 1(5).- стр. 25-33.
2. Новиков П.И., Моисеев С.В., Семенкова Е.Н., Стрижаков Л.А., Гуляев С.В., Янушкевич Т.Н., Никифорова Н.В., Мешков А.Д., Панасюк В.В., Сорокин Ю.Д., Парфенова С.А., Дубровская Л.В., Жабина Е.С., Кузнецова Е.И., **Лопатина И.А.**, Елонаков А.В., Сороцкая В.Н., Мухин Н.А.. Тяжелые и нежелательные эффекты при лечении биологическими препаратами у больных ревматическими заболеваниями // **Клиническая фармакология и терапия.**- 2013.- 1(5)- стр. 86-90.
3. S. Moiseev, P. Novikov, A. Meshkov, E. Kuznetsova, E. Zhabina, **I. Lopatina**, N. Bulanov Efficacy and Safety of Rituximab in Patients with SLE And Systemic Vasculitides // *Annals of the Rheumatic Diseases.*- 2013.- 72 (Suppl 3).- p. 642.
4. **I. Lopatina**, S. Moiseev, M. Mezentseva, P. Novikov, L. Russu, E. Isaeva. Cytokines Genes Expression in Peripheral Blood in Patients with Localized and Generalized Forms of Granulomatosis with Polyangiitis.// *Annals of the Rheumatic Diseases* Jun 2015, 74 (Suppl 2) P. 913-914.

5. **I. Lopatina**, S. Moiseev, M. Mezentseva, P. Novikov, L. Russu, E. Isaeva. Cytokines genes expression in peripheral blood in patients with relapse and remission of granulomatosis with polyangiitis. // *Nephron*. – 2015. – Vol. 129 (suppl 2). – p. 200-201.
6. E. Kuznetsova, S. Moiseev, E. Troitskaya, P. Novikov, L. Strizhakov, **I. Lopatina**, V. Scherbakova, Zh. Kobalava// Arterial stiffness in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) – a marker of activity or cardiovascular risk? // *Nephron*. – 2015. – Vol. 129 (suppl 2). – p. 213.
7. **Лопатина И.А.**, Моисеев С.В., Новиков П.И., Руссу Л.И., Исаева Е.И., Мезенцева М.В. Цитокиновый профиль у пациентов с гранулематозом с полиангиитом. // **Клиническая фармакология и терапия.**- 2017.- 26 (2).- стр. 6-11.
- 8 **Лопатина И.А.**, Моисеев С.В., Новиков П.И., Руссу Л.И., Исаева Е.И., Мезенцева М.В. Корреляция между клиническими данными и данными исследования цитокинов у больных гранулематозом с полиангиитом (Вегенера) // **Сеченовский вестник.**-2017.- 2(28).- стр.20-27
9. Мезенцева М.В., **Лопатина И.А.**, Моисеев С.В., Новиков П.И., Руссу Л.И., Исаева Е.И.. Влияние иммуносупрессивной терапии и глюкокортикостероидов на цитокиновый профиль у больных гранулематозом с полиангиитом (Вегенера) // **Лечение и профилактика.**- 2017.- № 3(23).- стр. 43-48
10. **Lopatina I.**, Moiseev S., Novikov P., Russu L., Mezentseva M.//Correlation between Cytokines Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Organ Damage in GPA Patients.// *Rheumatology*. – 2017. – Vol. 56 (Suppl. 3). – iii. 121.
11. **Lopatina I.**, Isaeva E., Moiseev S., Mezentseva M., Novikov P. Virus Infection Markers in Blood Circulation in Patients with Granulomatosis with Polyangiitis // *Rheumatology*. – 2017. – Vol. 56 (Suppl. 3). – iii. 126.