

Министерство здравоохранения Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА

(Сеченовский Университет)

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители

Доктор медицинских наук, профессор

Моисеев Сергей Валентинович

Доктор биологических наук

Мезенцева Марина Владимировна

Москва, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Эпидемиология.....	15
1.2 Классификация и патогенез ГПА.....	16
1.3 Цитокины и их функции.....	18
1.4 Исследование синтеза цитокинов при различных формах заболевания и при поражении различных органов и тканей.....	24
1.4.1 Цитокины при локальном и генерализованном ГПА. Исследование цитокинов, ответственных за развитие 1го и 2го типов иммунного ответа у больных ГПА.....	24
1.4.2 Изучение цитокинов у больных с обострением и ремиссией ГПА.....	27
1.4.3 Влияние цитокинов на различные клетки: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы у больных ГПА.....	29
1.4.4 Лечение ГПА и изменение уровня цитокинов.....	32
1.5 Заключение.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
2.1 Определение мРНК интерферонов и цитокинов в МПК методом ОТ-ПЦР.....	38
2.2 Определение содержания цитокинов в крови методом иммуноферментного анализа (ИФА).....	41
2.2.1 Иммуноферментное определение концентрации ФНО- α в сыворотке крови.....	41

2.2.2 Иммуноферментное определение концентрации ИЛ-8 в сыворотке крови.....	42
2.2.3 Иммуноферментное определение концентрации ИФН- α в сыворотке крови.....	43
2.2.4 Иммуноферментное определение концентрации ИЛ-18 в сыворотке крови.....	44
2.2.5 Иммуноферментное определение концентрации ИЛ-1 β в сыворотке крови.....	44
2.3 Статистический анализ.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
3.1 Клиническая характеристика обследованных больных ГПА.....	47
3.2 Исследование нарушений синтеза цитокинов на уровне транскрипции у больных ГПА.....	57
3.2.1 Исследование синтеза цитокинов на уровне транскрипции у больных с локальным и генерализованным ГПА.....	58
3.2.2. Исследование синтеза цитокинов на уровне транскрипции у больных с обострением и ремиссией ГПА.....	60
3.3 Исследование нарушений продукции цитокинов у больных ГПА.....	68
3.3.1 Оценка продукции цитокинов у больных ГПА, а также у больных имеющих признаки обострения или ремиссии заболевания.....	68
3.3.2 Оценка продукции цитокинов у больных локальной и генерализованной формами ГПА.....	72
3.4 Корреляция между клинико-лабораторными данными и цитокинами у больных ГПА.....	74
3.5 Факторы риска развития обострения ГПА в течение одного года.....	83
ГЛАВА 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	89

ВЫВОДЫ.....	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

Введение

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. [1,2,3]

В 2012 году в Чепел-Хилл была пересмотрена номенклатура системных васкулитов. Результаты пересмотра были впервые опубликованы в России в 2013 году. Приняты изменения в названии нозологической формы заболевания: гранулематоз с полиангиитом (ГПА) вместо гранулематоз Вегенера.[4] В настоящее время завершается переход к новой номенклатуре системного васкулита и наиболее оправдано использование нового названия нозологической формы заболевания: гранулематоз с полиангиитом (ГПА) .

Гранулематоз с полиангиитом (Вегенера) остается одним из самых тяжелых и прогностически неблагоприятных системных васкулитов [5,6]. Наиболее часто заболевание диагностируется у людей в возрасте 64-75 лет. [7] 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.[8] 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 [9,10].

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. [9] Цитокины могут выступать в роли эндогенных маркеров патологии, а определение уровней их синтеза может дать неоценимую информацию для диагностики нарушений гомеостаза, изучения

патогенеза заболеваний, адекватного назначения иммунотерапии.[11] Изучение указанных медиаторов межклеточного взаимодействия при активности и ремиссии ГПА позволяет определить цитокины, которые могут являться потенциальной мишенью терапевтического воздействия при обострении заболевания. [12,13]. Кроме того, важное значение в настоящее время придается изменению цитокинового спектра при локальной и генерализованной формах заболевания [14], так как при отсутствии лечения, более 80% больных с генерализованной формой ГПА погибают в течение одного года. [10]. При тяжелой форме заболевания необходимо раннее начало лечения с применением агрессивной схемы лечения, включающей циклофосфамид и глюкокортикостероиды. Больные с локальной формой ГПА, напротив, хорошо отвечали на менее агрессивную схему лечения с применением метотрексата и глюкокортикостероидов [15] Определение генерализованных форм заболевания на ранних этапах (или в дебюте болезни) с помощью исследования цитокинового профиля имеет важное значение, так как может способствовать определению тактики лечения и прогноза заболевания в целом. Исследование целого спектра цитокинов у больных ГПА позволит приблизиться к пониманию механизмов развития иммуновоспалительного процесса, а также влияния цитокинов на формирование органных поражений при ГПА. [16]

Степень разработанности проблемы

В зарубежной литературе приводятся противоречивые данные, касающиеся механизмов развития иммуновоспалительного процесса и методов оценки активности и распространенности ГПА. [17,18,19]. В отечественной практике проводилась работа по изучению изменений уровней цитокинов у больных с АНЦА-ассоциированными васкулитами. Автором выполнен анализ по изменению цитокинов у группы больных с тремя нозологическими формами системных васкулитов (гранулематоз с полиангиитом (Вегенера), микроскопический полиангиит, эозинофильный

гранулематоз с полиангиитом). Среди обследованных больных, пациенты с гранулематозом с полиангиитом (Вегенера) составляли небольшую статистическую группу (17 человек). Изучение изменения цитокинов только у больных гранулематозом с полиангиитом (Вегенера) не проводилось.[20]. 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 взаимосвязь 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 показано 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 показало, 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 ИЛ-8 как дополнительных маркеров активности ГПА. Определение сывороточного ИЛ-18 продемонстрировало наличие необходимой чувствительности и специфичности данного маркера в качестве дополнительного показателя наличия генерализованной формы ГПА. Изучение экспрессии гена ИЛ-18 также выявило достаточную чувствительность и специфичность данного показателя в качестве дополнительного маркера обострения 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

Полученные данные позволят приблизиться к пониманию механизмов развития иммуновоспалительного процесса у больных гранулематозом с полиангиитом (Вегенера), а также влияния цитокинов на формирование органных поражений 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

Показано, что мРНК ИЛ-18 в МПК достоверно чаще определяется у больных с обострением ГПА по сравнению со здоровыми лицами. 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. Проведенное исследование продемонстрировало, что сывороточный ИЛ-8 играет роль при обострении ГПА, однако использование его в качестве маркера обострения ГПА неоправдано в связи с низкой чувствительностью и специфичностью данного показателя. 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. 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.

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 медико-профилактического факультета 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 ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), в учебном процессе на кафедре внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии 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 - Изучение клинических и патофизиологических проявлений патологии внутренних органов с использованием клинических лабораторных, лучевых, иммунологических, генетических, патоморфологических, биохимических и других методов исследований, №3 - Совершенствование лабораторных, инструментальных и других методов обследования терапевтических больных, совершенствование диагностической и дифференциальной диагностики болезней внутренних органов, №5 - Совершенствование и оптимизация лечебных мероприятий и профилактики возникновения или обострения заболеваний внутренних органов, 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.

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 (Вегенера). В отечественной практике проводилась работа по изучению изменений уровней цитокинов у больных с АНЦА-ассоциированными васкулитами. Однако, изучение цитокинового профиля только при ГПА не проводилась. Также не показаны цитокины-маркеры 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 основной для последующего изучения данной проблемы Методологической базой является применение методов диагностики: ОТ-ПЦР (обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции) для определения транскрипции генов цитокинов в МПК и ИФА (иммуноферментного анализа) 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 (общий и биохимический анализ крови, оценка С-реактивного белка, СОЭ, исследования АНЦА, рентгенография, компьютерная томография, УЗИ-диагностика).

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 в клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева УКБ №3 (заведующий кафедрой и директор клиники – академик РАН, д.м.н., профессор Н. А. Мухин).

Глава 1. Обзор литературы.

Гранулематоз с полиангиитом (Вегенера) – это заболевание из группы системных васкулитов, для которого характерны некротизирующее гранулематозное воспаление и некротизирующий васкулит мелких сосудов с преимущественным поражением верхних дыхательных путей, легких и почек. [5]

Первое наблюдение заболевания относится к 1897 году и принадлежит Питеру Макбрайду. В 1931 году Клингер описал 70-летнего врача с артритом, экзофтальмом, воспалением верхних дыхательных путей, гломерулонефритом и поражением легких. Однако сам Клингер рассматривал это наблюдение как вариант узелкового периартериита, а не как самостоятельную нозологическую форму. В 1936 году Фридрих Вегенер опубликовал результаты клинических и гистологических исследований трех пациентов с аналогичными симптомами. В 1954 году Гудман и Чарг выделили триаду патологических признаков гранулематоза Вегенера: 1 - системный некротизирующий васкулит, 2 - некротизирующее гранулематозное воспаление дыхательных путей и 3 - некротизирующий гломерулонефрит. [21]

В 1990 г. эксперты Американской коллегии ревматологов (ACR) предложили критерии, позволяющие классифицировать системный васкулит как гранулематоз Вегенера:

1. Воспаление носа и полости рта (гнойные и/или кровянистые выделения из носа, язвы в полости рта)
2. Изменения в легких при рентгенологическом исследовании (узелки, инфильтраты, полости)
3. Изменения мочи (>5 эритроцитов в поле зрения или эритроцитарные цилиндры в осадке мочи)

4. Данные биопсии (гранулематозное воспаление в стенке артерии или в периваскулярном и экстраваскулярном пространстве)

Наличие двух и более критериев позволяет классифицировать системный васкулит как гранулематоз Вегенера с чувствительностью 88% и специфичностью 92%. [22]

Данные критерии были разработаны в результате проведения многофакторного анализа клинических, рентгенологических и гистологических данных 722 пациентов с системными васкулитами. Определение отличий гранулематоза Вегенера от других системных васкулитов имеет большое значение в связи с необходимостью применения ЦФА у данной группы больных, в отличие от некоторых других форм васкулитов. [23]

В 2012 году в Чепел-Хилл была пересмотрена номенклатура системных васкулитов. Результаты пересмотра были впервые опубликованы в России в 2013 году. Приняты изменения в названии нозологической формы заболевания: гранулематоз с полиангиитом (ГПА) вместо гранулематоз Вегенера. [4] В настоящее время завершается переход к новой номенклатуре системного васкулита и наиболее оправдано использование нового названия нозологической формы заболевания: гранулематоз с полиангиитом (ГПА) .

1.1 Эпидемиология

Гранулематоз с полиангиитом (Вегенера) (ГПА) остается одним из самых тяжелых и прогностически неблагоприятных системных васкулитов [5,24]. Наиболее часто заболевание диагностируется у людей в возрасте 64-75 лет [7] Заболеваемость ГПА варьируется от 2 до 12 случаев на 1 миллион жителей. Распространенность ГПА составляет от 23 до 160 случаев на 1 миллион жителей. [8]

1.2 Классификация и патогенез гранулематоза с полиангиитом

Приблизительно у четверти больных диагностируется локальная форма ГПА с преимущественным поражением верхних дыхательных путей, а также органа слуха, носа, придаточных пазух носа, органа зрения и глотки.[25,15] В середине 1960х гг. впервые были описаны локальные формы ГПА. Точное определение локального варианта ГПА отличалось в медицинской литературе. К примеру, локальный вариант ГПА именовался как «начальная», непочечная, «вялотекущая», «ранне-генерализованная», «локальная» и «локорегиональная» фазы. Тяжелую форму болезни называли «генерализованной», «классической» или «классической генерализованной» [15] Европейская группа по исследованию васкулитов () предлагает классифицировать ГПА по различным стадиям: локальный, ранний системный, генерализованный и тяжелое поражение почек. [26] (таб. 1)

**Классификация гранулематоза с полиангиитом (Вегенера),
предложенная EUVAS**

	Системный васкулит вне желудочно-кишечного тракта и легких	Угрожающее снижение функции жизненно-важных органов	Другие определения	Креатинин в сыворотке (ммоль/л)
Локализованный	Нет	Нет	Нет системных проявлений, ANCA обычно отрицательный	<120
Ранний системный	Есть	Нет	Системные проявления есть, ANCA-положительный или отрицательный	<120
Генерализованный	Есть	Есть	ANCA-положительный	<500
Тяжелый	Есть	Органная недостаточность	ANCA-положительный	>500

В настоящее время используют упрощенную классификацию при которой объединяют раннюю системную, генерализованную и тяжелую формы ГПА в «генерализованный» вариант ГПА. [10]

В основе патогенеза ГПА лежат разнообразные нарушения клеточного и гуморального иммунитета.[5] У большинства больных ГПА определяются антитела к протеиназе-3 (ПР3) азурофильных гранул нейтрофилов, обозначаемых АНЦА (антинейтрофильные цитоплазматические антитела). [4] Эти антитела распределяются диффузно в цитоплазме нейтрофилов. При активации клеток этот фермент (ПР3) экспрессируется на мембране клеток. Антитела против ПР3, связанные с нейтрофилами, стимулируют выброс

активированных радикалов кислорода, перекиси водорода и ферментов, разрушающих стенки сосудов. Эти активированные субстанции повреждают эндотелий сосудов, развиваются клеточные инфильтраты, гранулемы, гиалиноз и склероз стенок сосудов.[27,28] При развитии ГПА происходит адгезия лейкоцитов к эндотелиальным клеткам, пенетрация сосудистой стенки и высвобождение цитокинов и хемокинов. [29] Известно, что цитокины участвуют в экспрессии ПРЗ на поверхности нейтрофила.[30].

1.3 Цитокины и их функции

Цитокины представляют собой особый класс эндогенных полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия, регулирующих развитие, ряд физиологических функций и поддержание нарушенного гомеостаза. [31] Они влияют на функциональную активность клеток, принимающих участие в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. Воздействуя на Т- и В-лимфоциты, цитокины способны стимулировать индуцированные антигенами процессы в иммунной системе. [32] Представлены основные функции и клетки-продуценты некоторых цитокинов. (таб. 2)

Основные функции и клетки-продуценты цитокинов

Цитокины	Основные функции и клетки-продуценты цитокинов
ИФН-α	<ul style="list-style-type: none"> - активируют НК, обладают антипролиферативным и антивирусным действием. [33] - низкие концентрации ИФН-α приводят к усилению действия IL-12 и обеспечению TH1-ответа. - высокие концентрации ИФН α приводят к снижению продукции IL-12 и ИФН-γ НК, приводящее к уменьшению индукции TH1-ответа. Высокие дозы ИФН-α обеспечивают CD8+ ответ, усиливают экспрессию ИФН-γ CD8+ Тл. - продуцируются мононуклеарными фагоцитами, лимфоидными дендритными клетками.[32]
ИФН-γ	<ul style="list-style-type: none"> - активирует клеточное звено иммунитета, осуществляемого Т-лимфоцитами, НК-клетками и макрофагами. - активация макрофагов - активация НК-клеток - стимуляция экспрессии антигенов гистосовместимости II класса - регуляция синтеза изотипов иммуноглобулинов В-лимфоцитами - прямая антивирусная активность. - Продукция ИФН-γ контролируется несколькими факторами, включая цитокины дендритных клеток ИЛ-12 и ИЛ-18, активирующие дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в направлении Th1. - Продуцируется Т-лимфоцитами [31]
ИЛ- 1β	<ul style="list-style-type: none"> - главный медиатор развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма.

	<p>-способен очень быстро активировать практически все типы клеток, участвующих в формировании локальной воспалительной реакции, включая фибробласты, эндотелий, резидентные макрофаги и все типы лейкоцитов крови.</p> <p>- участвует в регуляции функций эндотелия и системы свертывания крови, индуцируя прокоагулянтную активность.[31,28,33]</p> <p>- стимулирует продукцию Т-хелперами ИЛ-2,</p> <p>- способствует проявлению рецепторов ИЛ-2 на Т-лимфоцитах,</p> <p>- влияет на созревание В-лимфоцитов,</p> <p>- стимулирует образование молекул МНС и образование гепатоцитами белков острой фазы.</p> <p>- усиливает функцию нейтрофилов и НК.</p> <p>- Оказывает провоспалительное и пирогенное действие (эндогенный пироген), обеспечивает взаимосвязь иммунной, нервной и эндокринной систем.</p> <p>-продуцируется моноцитами, макрофагами, дендритными клетками, астроцитами, фибробластами, НК-клетками, кератиноцитами и эндотелиальными клетками.[28]</p>
ИЛ-2	<p>-вырабатывается активированными Т-лимфоцитами, главным образом Th1.</p> <p>-Активирует дифференцировку Th1 и цитотоксических Т-лимфоцитов.</p> <p>- клетками-мишенями для действия ИЛ-2 служат Т и В – лимфоциты, НК-клетки, моноциты, тканевые макрофагоподобные клетки.[33]</p>
ИЛ-4	<p>- стимулирует дифференцировку Th0 в Th2,</p> <p>- синтез иммуноглобулинов В – лимфоцитами.</p> <p>- подавляет генерацию цитотоксических лимфоцитов, НК, а также продукцию ИФН-γ и противоопухолевую активность</p>

	<p>макрофагов.</p> <ul style="list-style-type: none"> - является противовоспалительным цитокином.[33] - продуцируется Th2 лимфоцитами, тучными клетками и стромальными клетками костного мозга.[31]
ИЛ-6	<ul style="list-style-type: none"> - стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов, тимоцитов - активирует предшественников ЦТЛ, гранулоцитов, макрофагов. - Активирует образование гепатоцитами белков острой фазы. - обеспечивает взаимосвязь иммунной, нервной и эндокринной систем. - является провоспалительным цитокином.[31] - продуцируется макрофагами, Т- и В- лимфоцитами, фибробластами, остеоцитами, эндотелиальными, эпидермальными и микроглиальными клетками.[28]
ИЛ-8	<ul style="list-style-type: none"> - является хемокином и играет роль хемоаттрактанта для нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов и эозинофилов. - вызывает миграцию нейтрофилов и базофилов в очаг воспаления и их дегрануляцию, выделение супероксидного радикала. - стимулирует ангиогенез.[33] - при многих заболеваниях легких, сопровождающихся воспалением легочной ткани, хемокины активно синтезируются альвеолярными макрофагами и находятся в повышенной концентрации в лаважной жидкости. - синтезируется активированными эндотелиальными клетками, моноцитами, фибробластами, кератиноцитами, гепатоцитами и другими клетками.[31]
ИЛ-10	<ul style="list-style-type: none"> - стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов, тимоцитов и тучных клеток. - подавляет синтез ИЛ-2 и ИФН-γ клетками Th1

	<ul style="list-style-type: none"> - угнетает клеточный иммунный ответ, продукцию провоспалительных цитокинов[32] - является противовоспалительным цитокином - синтезируется Th0 и Th2, а также CD8+ цитотоксическими Т-лимфоцитами, макрофагами и дендритными клетками.[28]
ИЛ-12	<ul style="list-style-type: none"> - стимулирует рост и дифференцировку Th (Th0 в Th1), CD8+ ЦТЛ, НК. - индуцирует продукцию ИФН-γ Т-лимфоцитами и НК, - угнетает апоптоз Th1, синтез IgE. - является провоспалительным цитокином. - играет большую роль в детерминировании Th1-ответа, который защищает организм от внутриклеточных патогенов. При отсутствии ИЛ-12 формирование Th1-зависимого протективного иммунного ответа против внутриклеточных микробов и паразитов невозможно. В результате начинает доминировать Th2 иммунный ответ, приводя к осложнению течения инфекций, вызванных внутриклеточными патогенами. - блокирует развитие Th2 и снижает продукцию IgE и IgA - продуцируют макрофаги, моноциты, В-лимфоциты и дендритные клетки. [31]
ИЛ-18	<ul style="list-style-type: none"> - обладает плейотропными эффектами в отношении многих типов клеток и влияет на секрецию различных медиаторов. - обладает как про-, так и противовоспалительной активностью - активирует НК - стимулирует продукцию таких провоспалительных цитокинов, как ИФН-γ, ФНО-α, ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1β, и противовоспалительных: ИЛ-4, ИЛ-13. Основной эффект – это индукция продукции ИФН-γ Т и НК клетками, Для продукции IFN-γ Т клетками требуется синергичное действие ИЛ-18 и ИЛ-12, в то время как ЕК-клеткам достаточно

	<p>взаимодействия только с ИЛ-18, хотя синергичное влияние ИЛ-18 и ИЛ-12 оказывает более сильный эффект .</p> <ul style="list-style-type: none"> - индуцирует созревание наивных CD4+ лимфоцитов в ИЛ-4 продуцирующие клетки <i>in vitro</i>, увеличивает секрецию ИЛ-13 НК и Т клетками. - индуцирует базофилы и тучные клетки к продукции ИЛ-4, ИЛ-13 и гистамина - продуцируется активированными макрофагами, в т.ч. купферовскими клетками печени, кератиноцитами и остеокластами, дендритными клетками, Т- и В-лимфоцитами. <p>ИЛ-18 экспрессируется на многих клетках - моноцитах, макрофагах, Т- и В- лимфоцитах, дендритных и эндотелиальных клетках, клетках микроглии. [34]</p>
ФНО-α	<ul style="list-style-type: none"> - провоспалительный цитокин - проявляет избирательную цитотоксичность в отношении некоторых опухолевых клеток, - активирует гранулоциты, макрофаги (синтез ИЛ-1 и ИЛ-6), эндотелиальные клетки, гепатоциты (продукция белков острой фазы), остеокласты и хондроциты (резорбция костной и хрящевой ткани) <p>Транскрипцию других провоспалительных цитокинов</p> <p>Стимулирует пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов, фибробластов, эндотелиальных клеток (ангиогенез), гемопоэтических клеток, Т- и В- лимфоцитов</p> <p>Усиливает поступление нейтрофилов из костного мозга в кровь</p> <p>Обладает противоопухолевой и противовирусной активностью <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i></p> <p>Продуцируется главным образом макрофагами, моноцитами и лимфоидными дендритными клетками.[32]</p>

Исследование участия цитокинов в развитии иммунопатологического процесса у больных ГПА представляет особый интерес в связи с возможностью применения генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) у данной группы больных.[35] Исследование целого спектра цитокинов у больных ГПА позволяет приблизиться к пониманию механизмов развития иммуновоспалительного процесса, а также влияния цитокинов на формирование органных поражений при гранулематозе с полиангиитом.[36]

1.4 Исследование синтеза цитокинов при различных формах заболевания и при поражении различных органов и тканей.

1.4.1 Цитокины при локальном и генерализованном ГПА.

Исследование цитокинов, ответственных за развитие 1го и 2го типов иммунного ответа у больных ГПА.

Ранее проводимые исследования указывали, на то, что у больных с локальным и генерализованным ГПА имеются отличия в экспрессии генов и продукции цитокинов. В 2001 году Reinhold-Keller и соавторы предположили, что назначение интерферона α , вероятно, могло спровоцировать развитие генерализованной форма ГПА у больных с первоначально локальной формой заболевания.[37]

В это же время Muller и соавторы проводили исследование экспрессии и продукции Th1 и Th2 цитокинов в тканях (биопсийный материал) и в периферических мононуклеарах у больных с локальной и генерализованной формами ГПА. [14] Th1 ответ усиливается под влиянием ИЛ-12, выделяемого макрофагами и ИФН- γ . Th1-лимфоциты продуцируют так называемые Th1-цитокины, включая ИЛ-2 и ИФН- γ . Th2-ответ усиливается под влиянием ИЛ-4, выделяемого тучными клетками и базофилами. Th2-лимфоциты продуцируют так называемые Th2-цитокины, включая ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13. [28]

Авторы обнаружили высокую продукцию ИФН- γ в тканях биопсии носа, а также в периферических мононуклеарах больных локальной формой ГПА, по сравнению с больными с генерализованной формой ГПА. Уровень мРНК ИЛ-10 в активированных периферических мононуклеарах у больных с локальной формой ГПА была выше по сравнению с группой с генерализованной формой или со здоровыми добровольцами. Авторы пришли к выводу о том, что в ткани носа в связи с преобладанием ИФН- γ позитивных клеток преобладает Th1 тип иммунного ответа. Кроме того, развитие локального иммунного ответа сопровождалось повышением уровня ИФН- γ и ИЛ-10 в периферических мононуклеарах. [14]

В 1999 году были выполнены 2 работы, посвященные оценке преобладания типа иммунного ответа у больных ГПА.

Csernok и соавторы проводили определение содержания ИФН- γ и ИЛ-4 у больных с ГПА в слизистой оболочке носа, бронхоальвеолярном лаваже и периферической крови с помощью методов ПЦР и ИФА. Т-клетки выделенные из области гранулематозного воспаления слизистой оболочки носа больных ГПА продуцировали только ИФН- γ , в то время как Т-клетки, выделенные из бронхоальвеолярного лаважа экспрессировали как ИФН- γ , так и ИЛ-4, с преобладанием ИФН- γ . Исследование продукции ИФН- γ периферическими мононуклеарами не показало статистически значимых различий по сравнению со здоровыми добровольцами. Однако у больных ГПА было отмечено достоверное повышение продукции ИФН- γ Т-клетками по сравнению со здоровыми добровольцами. Уровень продукции ИЛ-4 у больных ГПА по сравнению со здоровыми добровольцами статистически значимо не изменялся. Авторы пришли к выводу, что иммунный ответ 1-го типа преобладает в области гранулематозного воспаления у пациентов с ГПА.[38]

С целью исследования патогенетической роли цитокинов в развитии аутоиммунного васкулита, Tomer и соавторы в эксперименте проводили

иммунизацию мышей человеческим IgG –АНЦА, полученного у больных с ГПА. После иммунизации легкие и почки мышей исследовали с целью выявления признаков васкулита. Через 2 недели после иммунизации проводилось исследование уровня ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН- γ и ФНО- α методом ИФА. У иммунизированных мышей развилась периваскулярная мононуклеарная клеточная инфильтрация в легких, расцененная как васкулит. Уровни ИЛ-4, ИЛ-6, и ФНО- α , но не ИЛ-1 β , ИЛ-2 или ИФН- γ были значительно повышены через 2 недели после иммунизации. Авторы предполагают, что ИЛ-4, ИЛ-6 и ФНО- α принимают участие в начальной фазе аутоиммунного васкулита. По мнению авторов, данные цитокины способствуют развитию 2-го типа иммунного ответа при инициации экспериментального легочного васкулита, сходного как при ГПА. [39]

В 2009 году в работе Долгих С.В. было проведено исследование цитокинов у больных с АНЦА-ассоциированными васкулитами. При сравнении данных в группе с АНЦА-ассоциированными васкулитами отмечено достоверное повышение содержания ИЛ-1 β по сравнению с больными узелковым периартериитом. Выявлено отсутствие изменений в содержании ФНО- α у больных с АНЦА-ассоциированными васкулитами, узелковым периартериитом и здоровых добровольцев. Отмечено достоверное повышение продукции ИЛ-10 у больных с АНЦА--ассоциированными васкулитами по сравнению со здоровыми добровольцами. Кроме того, у больных с АНЦА--ассоциированными васкулитами по сравнению со здоровыми добровольцами достоверно повышался уровень ИЛ-2, ИФН- γ , ИЛ-4 и ИЛ-5. Автор приходит к выводу, что у больных с АНЦА-ассоциированными васкулитами наблюдается увеличение уровней цитокинов Th1, Th2.[20]

1.4.2 Изучение цитокинов у больных с обострением и ремиссией ГПА

Balding и соавторы проводили изучение продукции цитокинов в биоптатах слизистой носа и почек больных ГПА. Предыдущие исследования содержания Т-клеток в периферической крови демонстрировали повышение уровня продукции ИФН- γ и развитие 1го типа иммунного ответа. В данном исследовании методом иммуногистохимии проводилось изучение продукции цитокинов в слизистой оболочке носа у 10 пациентов с активной формой ГПА. Отмечено повышение содержания ИЛ-4, подавление ИЛ-2 и отсутствие ИФН- γ . Авторы сделали вывод о том, что при обострении заболевания, локально, в слизистой оболочке носа происходит активация цитокинов, ответственных за развитие 2го типа иммунного ответа. Кроме того, авторы проводили исследование содержания цитокинов в ткани биоптата почек больных с активной формой ГПА. Отмечено повышение продукции ИЛ-2 и ИЛ-4. [17]

В работе Lúdvíksson и соавт. отмечено, что у больных с активной формой ГПА по сравнению со здоровыми добровольцами выявлено изменение содержания цитокинов в периферической крови (метод ИФА). Отмечены значительное повышение уровня ИФН- γ , ответственного за развитие Th1 типа иммунного ответа, и неизменная продукция ИЛ-4 и ИЛ-5, участвующих в развитии Th2 типа иммунного ответа. [18]

В 2011 году Tomasson и соавторы проводили изучение влияния содержания маркеров активации тромбоцитов и маркеров воспаления при обострении ГПА. Методом ИФА определяли уровни С-реактивного белка, ИЛ-6 ИЛ-8 и АНЦА к протеиназе 3 у больных с обострением заболевания. По результатам проведенного обследования, выявлено, что все показатели, кроме ИЛ-6, изменяются при обострении заболевания. [40]

Abdulahad и соавт. привели результаты исследования уровней ИЛ-17, ИЛ-4 и ИФН- γ у больных с ремиссией ГПА. Методом проточной флоуметрии проводилось изучение содержания цитокинов в клетках периферической крови больных. Отмечено повышенное содержание Th17 клеток (ИЛ-17) и Th2 клеток (ИЛ-4) у больных с ремиссией ГПА по сравнению со здоровыми добровольцами. При сравнении крови больных с ремиссией ГПА и здоровых пациентов значимой разницы в содержании Th1 клеток (ИФН- γ) не выявлено. [19]

Richter и соавт. проводили исследование уровня ИЛ-8 у больных с обострением и ремиссией ГПА с использованием метода ИФА. Отмечено, что уровень ИЛ-8 достоверно коррелирует с активностью заболевания.[41]

Методом проточной флоуметрии Rani и соавторы выявили, что у больных с активной формой ГПА по сравнению с ремиссией ГПА отмечается угнетение экспрессии ИЛ-10 в периферических мононуклеарах, что указывает на снижение функции T-регуляторных клеток в активной фазе заболевания.[42]

В 2009 году Novick и соавторы исследовали уровень провоспалительного цитокина ИЛ-18 и его ингибитора, ИЛ-18-связывающего белка в сыворотке больных ГПА на разных стадиях заболевания. Выявлено, что уровни ИЛ-18, ИЛ-18-связывающего белка и свободного ИЛ-18 у больных с активной формой заболевания почти в 2 раза превышали показатели белков у больных с ремиссией ГПА. Во время ремиссии заболевания уровни данных маркеров были сопоставимы с данными, полученными при исследовании крови здоровых добровольцев. Повышение уровня ИЛ-18 и ИЛ-18-связывающего белка у больных с обострением ГПА позволяет предположить, что данные маркеры играют определенную роль в патогенезе ГПА. Авторы отмечают, что несмотря на повышение ИЛ-18-связывающего белка при обострении ГПА, свободный ИЛ-18 остается

повышенным при обострении, что предполагает его как потенциальную мишень терапевтического воздействия.[43]

Так как Т клетки занимают значительную часть гранулемы у больных с ГПА, Ludviksson и соавторы исследовали методом ИФА цитокиновый профиль Т клеток у больных ГПА. Как у больных с обострением ГПА, так и у больных с ремиссией ГПА выявлено повышение продукции ИЛ-12 моноцитами. Кроме того, отмечено, что *in vitro* продукция ИФН- γ снижается в зависимости от количества добавляемого ИЛ-10. Авторы предполагают, что повышение продукции ИФН- γ и ФНО- α у больных ГПА вызвано, вероятно, нарушением секреции ИЛ-12, а ИЛ-10 может быть мишенью для терапевтического воздействия. [18]

1.4.3 Влияние цитокинов на различные клетки: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы у больных ГПА.

Цитокины обладают плеiotропностью биологического действия. Один и тот же цитокин может действовать на многие типы клеток, вызывая различные эффекты в зависимости от вида клеток-мишеней.[32] В связи с этим проводилось изучение влияния цитокинов не только на развитие обострения заболевания, но и на различные клетки: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы.

ИЛ-2 представляет собой маркер активации лимфоцитов у больных с системными заболеваниями. Отмечено, что уровень плазменного растворимого рецептора ИЛ-2 повышается у больных с активной формой ГПА.[45]

Nattar и соавторы проводили изучение влияния АНЦА к антипротеиназе 3 на выработку цитокинов моноцитами. Авторы выявили, что протеиназа 3 экспрессируется на поверхности изолированных моноцитов. Стимуляция антителами к протеиназе 3 привела к значительному выбросу цитокинов, в первую очередь ФНО- α и ИЛ-1 β . Отмечено уменьшение

выработки ИЛ-6, ИЛ-8 и тромбоксана А2 моноцитами. Авторы делают вывод о том, что АНЦА к протеиназе 3 являются потенциальными индукторами выработки цитокинов моноцитами. А ФНО- α , ИЛ-1 β и тромбоксан А2 функционируют в качестве посредников в формировании секреторного ответа. [30]

В 2014 году Park и соавторы установили, что у больных с ГПА происходит активация моноцитов. У пациентов проводилось исследование уровня ФНО- α у больных ГПА через 4 и 24 часа после стимуляции моноцитов высокими концентрациями липополисахаридов. Отмечено, что стимулированные моноциты больных ГПА продуцируют достоверно меньше ФНО- α по сравнению с моноцитами здоровых добровольцев. Авторы приходят к выводу, что моноциты/макрофаги больных ГПА активируются по альтернативному пути. [46]

Нейтрофил-индуцированное поражение легких у больных ГПА изучалось в работе Nattar и соавт.. Было показано, что при воздействии ФНО- α на изолированные человеческие полиморфонуклеарные лейкоциты отмечается индукция поверхностной экспрессии протеиназы 3. Ко-перфузия ФНО- α , стимулированных нейтрофилов и моноклональных антител к протеиназе 3 индуцирует увеличение массы изолированных легких крыс. По мнению авторов, с-АНЦА индуцированный отек развился на фоне повышения коэффициента капиллярной фильтрации - маркера повышенной проницаемости эндотелия легочных сосудов. [47]

Учитывая, что нейтрофил играет одну из ведущих ролей в патогенезе заболевания, методом ИФА проводилось исследование клеточных культур у больных ГПА и здоровых добровольцах на наличие хемокинов, которые могли бы активировать или привлекать к участию нейтрофилы. Выявлено, что эндотелиальные клетки больных ГПА экспрессировали высокий уровень нейтрофил-активирующих хемокинов, в частности ИЛ-8. [48]

Изменение уровня ИЛ-8 у больных ГПА было описано в 2009 году. Uehara и соавторы опубликовали результаты исследований, посвященных изучению влияния АНЦА к протеиназе 3 на активацию мононуклеарных клеток у больных ГПА. Методом проточной цитометрии продемонстрировано, что при стимуляции мононуклеаров антителами к протеиназе 3 повышается экспрессия Toll-like рецепторов и NOD1 и NOD2 рецепторов. При этом повышается уровень ИЛ-8 в плазме больных ГПА. Также стимулирующий эффект отмечен на продукцию ИЛ-6 и ФНО- α . [49]

В 2011 году Richter и соавторы провели исследования хемотаксиса нейтрофилов у больных с ГПА. Авторы утверждают, что в связи с наличием у данных больных АНЦА, нейтрофил играет одну из ключевых ролей в патогенезе заболевания. В бронхоальвеолярном лаваже больных ГПА, методом ИФА, определяли количество ИЛ-8, ИЛ-1 β [41]. Повышенное содержание нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже больных с обострением ГПА ранее уже описывалась.[50,51] Цитокины играют важную регуляторную роль в миграции нейтрофилов в очаги воспаления.[52] Повышенная концентрация цитокинов приводила к нейтрофилии, которая ассоциируется с острым поражением легких и легочным фиброзом, вызванных повышением хемотаксиса в альвеолярной области.[53,54] Предыдущие исследования отмечают повышение уровня хемокинов, вызывающих нейтрофилию [55,56] в сыворотке больных ГПА и повышение СХС хемокинового лиганда (CXCL8) в клубочках почек больных с обострением ГПА.[57]

Richter и соавт. показали, что у больных с обострением и ремиссией ГПА по сравнению со здоровыми добровольцами повышено содержание не только нейтрофилов, но и общего количества клеток в бронхоальвеолярном лаваже. При исследовании содержания цитокинов в БАЛ больных ГПА обнаружено достоверное повышение содержания ИЛ-8 как при обострении,

так и при ремиссии заболевания. Достоверной разницы в содержании ИЛ-1 β в БАЛ больных ГПА выявлено не было.[41]

Наличие нейтрофилии имеет важное значение при ГПА из-за сильной ассоциации наличия заболевания и АНЦА. [58]. Исследование лейкоцитов у больных васкулитом выявило, что у больных ГПА обнаруживается повышение миграции нейтрофилов в легкие.[59] Поступление нейтрофилов в ткань представляет собой многоэтапный процесс, который частично координирует цитокины. Количество нейтрофилов в БАЛ больных ГПА коррелирует с повышением продукции ИЛ-8 и ИЛ-1 β , поэтому можно предположить, что данные цитокины влияют на поступление нейтрофилов в ткани. Данное предположение подтверждается и тем, что при назначении специфических антител к ИЛ-8 и ИЛ-1 β , происходит подавление хемотаксиса в БАЛ. Выраженность подавления хемотаксиса дает возможность предположить, что ИЛ-8 и ИЛ-1 β являются главными цитокинами, определяющими хемотаксис нейтрофилов в БАЛ.[41] Роль ИЛ-8 в качестве хемоаттрактанта нейтрофилов хорошо изучена, в то время как значение ИЛ-1 β остается неоднозначным, хотя известно, что ИЛ-1 β может вызвать слипание нейтрофилов[52,60] и индуцирует продукцию хемоаттрактантов для нейтрофилов, включая продукцию ИЛ-8. [61]

ИЛ-8 способен повысить адгезивность нейтрофилов и вызвать повышение экспрессии молекулы адгезии-1, способствуя формированию краевого стояния лейкоцитов.[56] ИЛ-8 имеет и другие механизмы воздействия на клетки у больных ГПА: АНЦА стимулируют выработку ИЛ-8 и моноцитами, и нейтрофилами. [57, 62] ИЛ-8 и другие цитокины, включая ФНО- α также стимулируют транслокацию протеиназы 3 на поверхность клетки, тем самым повышая вероятность связывания с АНЦА.[63,64]

1.4.4 Лечение ГПА и изменение уровня цитокинов

Тактика лечения ГПА определяется тяжестью заболевания.[15] При тяжелой (генерализованной) форме заболевания необходимо раннее начало

лечения с применением агрессивной схемы лечения, включающей циклофосфамид и глюкокортикостероиды [65] Больные с локальной формой ГПА, напротив, хорошо отвечают на менее агрессивную схему лечения с применением метотрексата и глюкокортикостероидов [15].

Оценка влияния проводимой терапии ГПА проводилась в работе Lamprecht и соавторов. Исследовали уровни ИЛ-12, ФНО- α и ИЛ-8 методами проточной флоуметрии у больных ГПА. Экспрессия ИЛ-12 и ФНО- α была значительно повышена у нелеченных больных ГПА по сравнению со здоровыми добровольцами. Уровень ИЛ-8 не повышался *in vitro*. После назначения стандартной дозы ЦФА и ГКС через 2 и 12 недель было констатировано снижение экспрессии ИЛ-12 и ФНО- α вплоть до нормализации их уровня. Авторы приходят к выводу, что активный метаболит циклофосфамида снижает количество мРНК ИЛ-12 *in vitro*. Моноцитарные цитокины, особенно ИЛ-12, могут играть важную роль в формировании раннего иммунорегуляторного ответа в пользу Th1. ЦФА в сочетании с ГКС проявляют свои эффекты путем нормализации цитокинового ответа Th1 типа, а ЦФА может поддерживать данную модель развития цитокинового ответа. [66]

В нескольких неконтролируемых исследованиях сообщалось, что применение ингибиторов ФНО- α приводит к индукции ремиссии ГПА.[67,68,69,70]. Но при последующем проведении двойного-слепого плацебо-контролируемого исследования с использованием этанерцепта (конкурентный ингибитор связывания ФНО- α) у больных ГПА были получены данные, отличающиеся от предыдущих. В исследовании с использованием этанерцепта принимало участие 180 больных ГПА, которые были разделены на 2 группы – группу получающую этанерцепт и группу получающую плацебо в добавлении к стандартной терапии. Стандартная терапия включала назначение преднизолона и циклофосфамида (для тяжелой формы заболевания) и метотрексат (при локальном ГПА). Этанерцепт вводили подкожно по 25 мг 2 раза в неделю. Дозу глюкокортикостероидов

постепенно снижали на протяжении 6 месяцев. Использование этанерцепта не повлияло на частоту достижения длительной ремиссии у больных ГПА [71]

В последние годы большое внимание уделяется изучению полиморфизму генов цитокинов у больных ГПА. В 2015 году опубликованы результаты большого мета-анализа Jung и соавторов. В исследование было включено 4121 пациент с васкулитом и 5504 здоровых добровольцев. Проводилось изучение влияния полиморфизма ИЛ-10 на развития васкулита. Авторы отметили, что у больных с гранулематозом с полиангиитом имеется зависимость с наличием аллеля G ИЛ-10-1082.[72]

1.5 Заключение:

Исследование патогенетической роли цитокинов в развитии гранулематоза с полиангиитом проводится уже длительное время. Развитие локального иммунного ответа при ГПА сопровождается повышением уровня ИФН- γ (1й тип иммунного ответа)[14], однако при обострении заболевания повышается экспрессия цитокинов, ответственных за развитие 2го типа иммунного ответа.[17,39] В нескольких работах отмечено, что уровень ИЛ-8 достоверно коррелирует с активностью ГПА[40,41], а повышение уровня ИЛ-18 и ИЛ-18-связывающего белка у больных с обострением ГПА позволяет предположить, что данные маркеры играют определенную роль в патогенезе и течении болезни.[43] Применение стандартных схем лечения проявляет свои эффекты путем изменения цитокинового ответа у больных ГПА.[70,71,72] В зарубежной литературе приводятся противоречивые данные, касающиеся механизмов развития иммуновоспалительного процесса и методов оценки активности и распространенности ГПА. [17,18,19]. В отечественной практике проводились работы по изучению изменений уровней цитокинов у больных с АНЦА-ассоциированными васкулитами [36], однако определение дополнительных маркеров обострения и наличия генерализованных форм ГПА, а также взаимосвязи органных поражений и

изменения уровней цитокинов не изучены. Исследование целого спектра цитокинов у больных ГПА позволит приблизиться к пониманию механизмов развития иммуновоспалительного процесса, а также влияния цитокинов на формирование органных поражений при ГПА. [16] .

Глава 2. 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 Чапел-Хилл (США). [22] Все пациенты подписали информированное согласие участия в исследовании, протокол которого был одобрен этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет).

Общее обследование больных проводилось по плану, принятому в клинике. При изучении анамнеза особое внимание уделяли наличию активности заболевания, наличию поражений различных органов и систем. Для оценки активности использовали шкалу BVAS (Бермингемский индекс активности васкулита). [73] 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. [74] При оценке индекса повреждения, учитываются повреждения органов, которые наблюдаются со времени возникновения васкулита. У пациентов часто бывают сопутствующие заболевания, возникшие до развития васкулита, которые не должны учитываться. Проявления активного васкулита регистрируются при помощи шкалы BVAS.

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. Генерализованный ГПА включает в себя ранний системный, генерализованный и тяжелый варианты заболевания, которые выделяют в соответствии с классификацией Европейского общества по изучению васкулитов (EUVAS).[24, 75,76]

У всех больных оценивали наличие признаков васкулита и/или гранулематоза. [77, 78, 79, 80] (таб. 3)

Таблица 3

Критерии васкулита и гранулематозного воспаления.

Критерии васкулита	Критерии гранулематозного воспаления
<p>1. Гломерулонефрит</p> <p>Гематурия или гематурия в сочетании с протеинурией</p> <p>Гистологическая картина фокального сегментарного малоиммунного гломерулонефрита с полулуниями</p>	<p>1. Гранулематозное воспаление при биопсии</p>
<p>2. Внепочечный васкулит:</p> <p>Кожный васкулит</p> <p>Эписклерит</p> <p>Множественный мононеврит</p>	<p>2. Инфильтраты/узлы в легких: стойкие (более 1 мес) с распадом, образованием полостей и/или стенозирующий эндобронхит</p>
	<p>3. Поражение ЛОР-органов или глаз:</p> <p>Перфорация носовой перегородки</p> <p>Деструктивный синусит</p> <p>Подскладочный стеноз гортани или трахеи</p> <p>Псевдотумор орбиты</p> <p>Полиповидное утолщение слизистой придаточных пазух носа, мастоидит (длительностью не менее 3 мес)</p>

2.1 Определение мРНК цитокинов в МПК методом ОТ-ПЦР.

Определение мРНК цитокинов в МПК методом ОТ-ПЦР провели у 57 из 60 клинически обследованных больных ГПА. У 3х больных исследование цитокинового профиля методом ОТ-ПЦР не проводилось. В качестве контроля проводили исследование экспрессии мРНК цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови 40 здоровых доноров.

Метод проведения ОТ-ПЦР: 5 мл крови пациента собирали в пробирку с ЭДТА, тщательно перемешивали. На 200 мкл феккола наслаивали кровь, центрифугировали 30 минут на 1500 оборотов в минуту. Через 30 минут снимали лейкоцитарное кольцо – средняя прослойка - и помещали в отдельную пробирку. Лейкоцитарную взвесь отмывали с 180 мкл физиологического раствора в центрифуге 2 раза по 10 минут на 1500 оборотов в минуту. После второй промывки, физиологический раствор смывали, добавляли 300 мкл лизирующего раствора. Хранили при -20°C.

РНК выделяли методом, предложенным P. Chomczynski и N. Sacchi [81] с использованием набора для выделения Научно-производственной компании СИНТОЛ. Выделение РНК проводили согласно протоколу для выделения тотальной РНК из образцов цельной крови.

Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация были выполнены в соответствии с методикой, предложенной С. Gelder. [82]

Отбирали необходимое количество микропробирок объемом 0,2 (0,5) мл. Приготавливали реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix вносили 5 мкл RT-G-mix-1 (RT-G-mix-2), тщательно перемешивали на вортексе, осаждали капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. К полученному раствору добавляли 6 мкл ревертазы (MMlv), пипетировали 5 раз, перемешивали в вортексе. Далее осаждали капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. Вносили в микропробирки по 10 мкл готовой реакционной смеси. Используя

наконечник с аэрозольным барьером, добавляли по 10 мкл РНК-пробы в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешивали пипетированием. Ставили пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 37°C на 30 минут. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР разводили в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавляли 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешивали пипетированием 10 раз). Готовый препарат кДНК хранить при температуре -20°C.

Для проведения ПЦР использовались следующие праймеры: ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- α .

В пробирки, объемом 0,5-0,6 мкл. закапывали 0,2 мкл праймера. Далее готовили реакционную смесь (H₂O 260 мкл + буфер + Mg 35 мкл + смесь ДНТП 10-ти кратная 6,5 мкл + образец 34 мкл + полимеразы 10,2 мкл). Затем перемешивали и добавляли в каждую пробирку по 23 мкл со своим праймером. (делается всё на льду). Далее ставили в амплификатор. ПЦР проводили в объеме 25 мкл на программируемом амплификаторе «Терцик» производства АО «ДНК-технология», г. Москва (таб. 4,5).

Таблица 4

Температурные циклы для амплификации

I		95 ⁰ C	1 мин
II	1 Денатурация матричной ДНК	94	1 мин
	2 Отжиг праймеров	T от	30 сек
	3 Синтез ДНК	72	30 сек
III	Достройка синтезированной ДНК	72	7 мин
IV		10	Хран.

Таблица 5

Температура отжига праймеров

Цитокин	ИФН- α	ИФН- γ	ИЛ-1 β	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-12	ИЛ-18	ФНО- α	β -актин
0 ⁰ C	50	48	50	50	48	48	58	50	50	50	60	58

После амплификации продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 1% агарозном геле. В качестве позитивного контроля амплификации 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).[83]

Фотографировали результаты на цифровую камеру Gel Imager-2 (Хеликон) под мягким ультрафиолетовым освещением 360 нм.

2.2 Определение содержания цитокинов в крови методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Содержание цитокинов в сыворотки крови больных ГПА определяли у 40 больных. Проводилось исследование ИНФ- α , ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-1 β и ФНО- α с использованием метода иммуноферментного анализа. Методика проведения представлена ниже.

2.2.1 Иммуноферментное определение концентрации ФНО- α в сыворотке крови

Для количественного определения содержания ФНО- α использовали коммерческие наборы для ИФА ЗАО «Вектор-Бест». Образцы крови собирали во время визитов пациентов и сразу же замораживали при -40°C . Метод определения основан на «сэндвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к ФНО- α .

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубировали 2 часа в шейкере при 37°C и 700 об/мин. с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ФНО- α связывался с иммобилизованными антителами. Связавшийся ФНО- α взаимодействовал при инкубации 1 час в шейкере при 37°C и 700 об/мин. с конъюгатом №1 (антитела к ФНО- α человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействовал при инкубации 30 мин при 37°C и 700 об/мин с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена). Количество связавшегося конъюгата №2 определяли цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена-тетраметилбензидина, после инкубации на протяжении 25 мин при $18-25^{\circ}\text{C}$. Измерение оптической плотности проводили

с помощью спектрофотометра в двуволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Интенсивность желтого окрашивания была пропорциональна концентрации содержащегося в образце ФНО- α . После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию ФНО- α в анализируемых образцах.

2.2.2 Иммуноферментное определение концентрации ИЛ-8 в сыворотке крови

Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» - варианте иммуноферментного анализа. Специфическими реагентами набора являлись моноклональные антитела к ИЛ-8, сорбированные на поверхности лунок разборного полистирольного планшета, конъюгат поликлональных антител к ИЛ-8 с биотином и калибровочные образцы, содержащие ИЛ-8.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубировали 2 часа в шейкере при 37 С и 700 об/мин. с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ИЛ-8 связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся ИЛ-8 взаимодействовал при инкубации 1 час в шейкере при 37С и 700 об/мин. с конъюгатом №1 (антитела к ИЛ-8 человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействовал при инкубации 30 мин при 37С и 700 об/мин с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена). Количество связавшегося конъюгата №2 определяли цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена-тетраметилбензидина, после инкубации на протяжении 25 мин при 18-25С. Измерение оптической плотности проводили с помощью спектрофотометра в двуволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Интенсивность желтого окрашивания была пропорциональна концентрации содержащегося в образце ИЛ-8. После измерения оптической плотности раствора в лунках на

основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию ИЛ-8 в анализируемых образцах.

2.2.3 Иммуноферментное определение концентрации ИФН- α в сыворотке крови

Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» - варианте иммуноферментного анализа. Специфическими реагентами набора являлись моноклональные антитела к ИФН- α , сорбированные на поверхности лунок разборного полистирольного планшета, конъюгат моноклональных антител к ИФН- α с пероксидазой хрена и калибровочные образцы, содержащие ИФН- α .

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубировали 2 часа в шейкере при 18-25 С и 700 об/мин. с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ИФН- α связывался с иммобилизованными антителами. Связавшийся ИФН- α взаимодействовал при инкубации 1 час в шейкере при 18-25С и 700 об/мин. с конъюгатом антител к ИФН- α человека с пероксидазой хрена. Количество связавшегося конъюгата определяли цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена-тетраметилбензидина, после инкубации на протяжении 25 мин при 18-25С. Измерение оптической плотности проводили с помощью спектрофотометра в двуволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Интенсивность желтого окрашивания была пропорциональна концентрации содержащегося в образце ИФН- α . После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию ИФН- α в анализируемых образцах.

2.2.4 Иммуноферментное определение концентрации ИЛ-18 в сыворотке крови

Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» - варианте иммуноферментного анализа с применением двух типов моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к ИЛ-18.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубировали 2 часа в шейкере при 37 С и 700 об/мин. с иммобилизованными антителами к ИЛ-18. Имеющийся в образцах ИЛ-18 связывался с иммобилизованными антителами. Связавшийся ИЛ-18 взаимодействовал при инкубации 1 час в шейкере при 37С и 700 об/мин. с конъюгатом №1 (антитела к ИЛ-18 человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействовал при инкубации 30 мин при 37С и 700 об/мин с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена). Количество связавшегося конъюгата №2 определяли цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена-тетраметилбензидина, после инкубации на протяжении 25 мин при 18-25С. Измерение оптической плотности проводили с помощью спектрофотометра в двуволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Интенсивность желтого окрашивания была пропорциональна концентрации содержащегося в образце ИЛ-18. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию ИЛ-18 в анализируемых образцах.

2.2.5 Иммуноферментное определение концентрации ИЛ-1β в сыворотке крови

Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» - варианте иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к ИЛ-1 β.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубировали 2 часа в шейкере при 37 С и 700 об/мин. с

иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ИЛ-1 β связывался с иммобилизованными антителами. Связавшийся ИЛ-1 β взаимодействовал при инкубации 1 час в шейкере при 37С и 700 об/мин. с конъюгатом №1 (антитела к ИЛ-1 β человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействовал при инкубации 30 мин при 37С и 700 об/мин с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена). Количество связавшегося конъюгата №2 определяли цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена-тетраметилбензидина, после инкубации на протяжении 25 мин при 18-25С. Измерение оптической плотности проводили с помощью спектрофотометра в двуволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Интенсивность желтого окрашивания была пропорциональна концентрации содержащегося в образце ИЛ-1 β . После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию ИЛ-1 β в анализируемых образцах. [44]

2.3 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. Различия средних величин считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для обработки результатов исследования цитокинов с использованием метода ИФА применяли непараметрические методы статистического анализа, а именно критерий Вальда- Вольфовица и критерий Колмогорова-Смирнова. Различия средних величин считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для расчета показателей диагностической эффективности метода проводилось построение ROC-кривых с использованием следующих формул:
чувствительность (%) = истинно положительный результат / (истинно положительный результат + ложноотрицательный результат) × 100%;
специфичность (%) = истинно отрицательный результат / (истинно отрицательный результат + ложноположительный результат) × 100%;

Исследование корреляционной связи проводили с использованием непараметрического метода статистического анализа – гамма-корреляции. Результат считался статистически значимым при $p < 0,05$.

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.

Глава 3. Результаты

3.1 Клиническая характеристика обследованных больных ГПА

Обследовано 60 больных (21 мужчина и 39 женщин) в возрасте от 18 до 80 лет с установленным диагнозом ГПА. Средний возраст обследованных больных составлял $48,9 \pm 15,6$ лет. Диагноз ГПА ($n=60$) был установлен в соответствии с номенклатурой, принятой в 2012 году на конференции в Чепел-Хилл (США), а также на основании наличия по крайней мере 2 из 4 критериев Американской коллегии ревматологов (ACR), 1990 г. [22] Для подтверждения диагноза ГПА у 40 (66,7%) больных была выполнена биопсия: слизистой носа или придаточных пазух носа - у 17 (28,3%) больных, образования гортани - у 5 (8,3%) человек, биопсия орбиты - у 12 (20,0%), кожи - у 1 (2,3%), барабанной полости - у 1 (2,3%), легких - у 1 (2,3%), бронхов - у 1 (2,3%), конъюнктивы - у 1 (2,3%).

Средний срок от начала заболевания до установки диагноза и начала лечения составил $18,3 \pm 32,32$ месяцев. На момент обследования средняя длительность ГПА в годах составляла $5,7 \pm 4,8$ (в месяцах $69,6 \pm 57,7$).

У 22 из 60 больных у была выявлена локальная форма ГПА (поражение верхних дыхательных путей, органа слуха и зрения). Локальная форма была диагностирована у 7 мужчин и 15 женщин в возрасте от 18 до 70 лет (медиана по возрасту 47,5 лет).

У 38 больных определялась генерализованная форма ГПА. У 14 мужчин и 24 женщин в возрасте от 22 до 80 лет (медиана по возрасту 52,5 года) было выявлено поражение верхних дыхательных путей, органа зрения, слуха в сочетании с поражением легких и/или почек. У 22 (57,9%) из 38 пациентов с генерализованным ГПА в дебюте заболевания определялась локальная форма заболевания. Среднее время развития генерализованной формы у данных пациентов составило $11,7 \pm 18,4$ месяца.

С использованием шкалы BVAS у всех 60 больных проводилась оценка наличия обострения или ремиссии заболевания. Среднее значение BVAS составило 2,7 баллов. Минимальное значение – 0 баллов, максимальное – 18 баллов.

У 32 больных (11 мужчин и 21 женщины) в возрасте от 25 до 80 лет определялось 2 и более баллов по шкале BVAS, что расценивалось как обострение заболевания. Средний возраст данной группы больных составлял $50,84 \pm 14,07$ лет, медиана по возрасту - 51,5 лет. Ремиссия ГПА была диагностирована у 28 больных (10 мужчин и 18 женщин) в возрасте от 18 до 77 лет. Средний возраст в данной группе больных составляет $46,71 \pm 17,27$ лет, медиана по возрасту 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.

Из 60 обследованных больных ГПА наиболее часто определялось поражение носа и придаточных пазух. Более половины обследованных больных имели поражение легких (58,3%), у 46,7% больных ГПА наблюдалось поражение почек в рамках васкулита. Частота развития поражений органов у больных ГПА представлена в таб. 6.

Частота развития поражений органов у больных ГПА

	N (%)
Поражение носа и ППН	57 (95.0%)
Поражение органа слуха	29 (48.3%)
Поражение органа зрения	33 (55.0%)
Поражение гортани	16 (26.7%)
Поражение легких	35 (58.3%)
Поражение почек	28 (46.7%)

Поражение носа и придаточных пазух носа. Частота поражения носа и придаточных пазух носа у обследованных больных составила 95,0% (n=57). Чаще всего встречались язвенно-некротический ринит (n=49), поражение придаточных пазух носа в виде утолщения слизистой пазух (n=41), реже - перфорация носовой перегородки (n=30) и деструктивный синусит (n=36).

Поражение лёгких. Поражение лёгких определялось у 35 (58,3%) больных ГПА. Чаще всего при рентгенографии или компьютерной томографии легких выявлялись инфильтраты (n=35), реже – полости в легких (n=6). У одного больного (1,7%) ГПА был диагностирован геморрагический альвеолит.

Поражение почек. Поражение почек было выявлено у 46,7% больных ГПА (n=28). Из 28 больных ГПА имеющих поражение почек в рамках васкулита, у 19 (31,67%) пациентов скорость клубочковой фильтрации была снижена более чем на 50% (среднее значение креатинина $2,16 \pm 1,55$ мг/дл, среднее значение СКФ $35,8 \pm 14,9$ мл/мин/1,73 м²). Из 28 больных с поражением почек у 18 (30,0%) человек была выявлена протеинурия, при

этом протеинурия более 0,5 г/сут определялась у 10 (16,7%) пациентов, гематурия – у 12 (20,0%) больных. Биопсия почки обследованным больным не проводилась.

Поражение органа зрения: Наиболее часто у больных обследованных больных ГПА определялось гранулематозное поражение орбиты - (n=15). У 10 (16,7%) больных ГПА развился увеит, у 3 (5,0%) - эписклерит, которые были купированы иммуносупрессивной терапией и поэтому расценивались как проявление основного заболевания.

Поражение органа слуха: Наиболее часто поражение органа слуха у больных ГПА ассоциировалось с наличием одно- или двухсторонней тугоухости (n=16). В 21,7% случаев (n=13) был выявлен хронический отит. Гранулематозное поражение сосцевидного отростка (мастоидит) наблюдалось у 9 (15,0%) обследованных больных.

Поражение суставов: У 8 (13,3%) больных ГПА наблюдалось поражение суставов, проявляющееся артралгиями.

Поражение нервной системы: Множественный мононеврит был диагностирован у 4 (6,7%) больных гранулематозом с полиангиитом.

Поражение кожи: Определялось у 5 (8,3%) больных ГПА и проявлялось сосудистой пурпурой.

Поражение сердечно-сосудистой системы. Поражение сердца наблюдалось у 24 (40,0%) больных ГПА. У 22 (36,7%) пациентов по данным ЭХО-КГ определялись атеросклеротические изменения аортального клапана. Кардиомиопатия и хроническая сердечная недостаточность определялась у 2 (3,3%) больных ГПА. Перикардит был диагностирован у 3 (5,0%) пациентов.

У всех пациентов определялось наличие клинических эквивалентов васкулита и гранулематозного воспаления. Признаки васкулита были выявлены у 34 (56,7%) пациентов, признаки гранулематозного воспаления – у 45 (75,0%) больных. (Таб. 7)

Частота развития признаков васкулита и гранулематозного воспаления у больных ГПА.

Признаки васкулита	34 (56.7%)
Гломерулонефрит	28 (46.7%)
Гематурия или гематурия в сочетании с протеинурией	28 (46.7%)
Внепочечный васкулит	12 (20.0%)
Кожный васкулит	5 (8.3%)
Эписклерит	3 (5.0%)
Множественный мононеврит	4 (6.67%)
2. Признаки гранулематозного воспаления	45 (75.0%)
Гранулематозное воспаление при биопсии	40 (66.7%)
Инфильтраты/узлы в легких: стойкие (более 1 мес) с распадом, образованием полостей и/или стенозирующий эндобронхит	35 (58.3%)
Поражение ЛОР-органов или глаз:	
Перфорация носовой перегородки	30 (50.0%)
Деструктивный синусит	37 (61.7%)
Подскладочный стеноз гортани или трахеи	16 (26.7%)
Псевдотумор орбиты	15 (25.0%)
Полипвидное утолщение слизистой придаточных пазух носа (длительностью не менее 3 мес)	42 (70.0%)
мастоидит (длительностью не менее 3 мес)	9 (15.0%)

Из 12 (20,0%) больных ГПА, имеющих внепочечные проявления васкулита (кожный васкулит, эписклерит, мононеврит), у 7 (11,6%) больных было выявлено сочетание внепочечных проявлений васкулита с поражением почек в рамках ГПА. У 5 (8,3%) больных ГПА отсутствовали данные за поражение почек: (2 (3,3%) пациента имели локальную форму ГПА, 3 (5,0%) пациента - генерализованную форму ГПА с поражением легких.

Частота поражений органов, развития признаков гранулематозного воспаления и васкулита в зависимости от наличия обострения или ремиссии заболевания, локальной или генерализованной формы ГПА представлена в таб. 8.

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

	Форма заболевания		Период заболевания	
	Локальная (n=22)	Генерализованная (n=38)	Обострение (n=32)	Ремиссия (n=28)
VDI	7,27±2,62	13, 71±4,68	12,13±5,28	10,46±4,82
Поражение органа зрения	12 (54.5%)	21 (55.3%)	13 (40.62%)	20 (71.4%)
Поражение органа слуха	8 (36.4%)	21 (55.3%)	12 (37.5%)	17 (60.7%)
Поражение носа, придаточных пазух носа	20 (90.9%)	37 (97.4%)	32 (100.0%)	25 (89.3%)
Поражение гортани	7 (31.8%)	9 (23.7%)	8 (25.0%)	8 (28.6%)
Поражение легких	0	35 (92.1%)	22 (68.8%)	13 (46.4%)
Поражение почек	0	28 (73.7%)	14 (43.8%)	14 (50.0%)
Признаки васкулита	3 (13.6%)	31 (81.5%)	19 (59.4%)	15 (53.6%)
Признаки гранулематозного воспаления	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. Основные лабораторные показатели представлены в таб. 9.

**Лабораторные показатели у больных ГПА в зависимости от формы
и периода заболевания.**

	Общее	Форма заболевания		Период заболевания	
		Локальный ГПА (n=22)	Генерализо- ванный ГПА (n=38)	Обострение (n=32)	Ремиссия (n=28)
Скорость клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1,73 м ²	19 (31.7%)	0	19 (50.0%)	11 (34.4%)	8 (28.6%)
Протеинурия	18 (%)	0	18 (47.4%)	9 (28.%)	9 (28.1%)
Протеинурия более 0,5 г/сут	10 (16.7%)	0	10 (26.3%)	6 (18.8%)	4 (14.3%)
Повышение уровня креатинина в крови	16 (26.7%)	0	16 (42.1%)	10 (31.3%)	6 (10.0%)
Среднее значение креатинина, мг/дл	1.29±1.1	0.91±0.2	1.5±1.3	1.48±1.4	1.08±0.4
СКФ расч. СКД-ЕPI, мл/мин	67.3±28.3	80.1±19.9	59.9±28.2	62.5±28.1	72.7±28.0
Гематурия	12 (20.0%)	0	12 (31.6%)	8 (25.0%)	4 (14.3%)
Среднее значение суточной протеинурии, г/сут	0.21±0.6	0.03±0.1	0.32±0.7	0.26±0.7	0.16±0.3
Повышение СОЕ	29 (48.3%)	7 (31.8%)	22 (57.9%)	20 (62.5%)	9 (32.1%)
Среднее значение СОЕ, мм/ч	18.02±16.8	12.23±7.3	21.37±19.8	23.69±20.6	11.54±7.1
Повышение СРБ	13 (21.67%)	2 (9.1%)	11 (28.9%)	12 (37.5%)	1 (3.6%)

Снижение скорости клубочковой фильтрации более чем на 50% было диагностировано у 19 (31,67%) пациентов ГПА, имеющих почек в рамках васкулита. У 1 (1,7%) пациента отмечалось развитие БПГН (нарастание креатинина с 5 мг/дл 8,3 мг/дл). Мочевой синдром у больных ГПА в основном проявлялся гематурией и протеинурией (ПУ до 1г/сут у 16 (89,5%), 1-3 г/сут - 1 (5,3%), более 3г/сут (нефротический синдром) - 1 (5,3%), которые чаще встречали 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%). (таб. 10)

Прием лекарственных препаратов у больных с различными формами и периодом ГПА.

	Общее	Форма заболевания		Период заболевания	
		N=60	Локальная (n=22)	Генерализованная (n=38)	Обострение (n=32)
Прием ГКС на момент обследования	56 (93.3%)	20 (90.9%)	36 (94.7%)	30 (93.8%)	26 (92.9%)
ГКС более 20 мг/сут	24 (40.0%)	16 (72.7%)	8 (21.1%)	19 (59.4%)	5 (17.9%)
Длительность приема ГКС в годах	4.07±4.6	3,28±4.6	4.52±4,5	4.19±4,9	3.93±4,3
Длительность приема ГКС в месяцах	49.17±54.3	38.95±53.9	55.08±54,4	50.09±57.6	48.11±51.3
Прием ЦФА	24 (40.0%)	7 (31.8%)	17 (44.7%)	12 (37.5%)	12 (42.9%)
Доза ЦФА, суммарно	27.84±40.7	15.7±26.2	35.05±46.1	24.84±42.4	31.18±39.2
Прием азатиоприна	11 (18.3%)	5 (22.7%)	6 (15.8%)	5 (15.6%)	6 (21.4%)
Прием метотрексата	9 (15.0%)	6 (27.3%)	3 (7.9%)	5 (15.6%)	4 (14.3%)
Прием микфенолата мофетила	1 (1.7%)	0	1 (2.6%)	1 (3.1%)	0
Прием биологических препаратов	3 (5.0%)	0	3 (7.9%)	2 (6.3%)	1(3.6%)

3.2 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 со здоровыми добровольцами ($n=40$). (таб. 11)

Таблица 11

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 (2.5)
ИФН- γ	10 (17.54)	12 (30.0)
ИЛ-1 β	27 (47.36)	14 (35.0)
ИЛ-2	8 (14.03)	0
ИЛ-4	3 (5.26)	0
ИЛ-6	17 (29.82)	8 (20.0)
ИЛ-8	25 (43.85)*	4 (10.0)
ИЛ-10	14 (24.56)	8 (20.0)
ИЛ-12	3 (5.26)**	28 (70.0)
ИЛ-18	30 (52.63)	12 (30.0)
ФНО- α	17 (29.82)**	30 (75.0)

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$ (метод Манна-Уитни)

3.2.1. 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 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. (таб. 12)

Таблица 12

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 (2.5)
ИФН- γ	2 (9.09)	8 (22.85)	12 (30.0)
ИЛ-1 β	11 (50.0)	16 (45.71)	14 (35.0)
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 (20.0)
ИЛ-8	11 (50.0)**	14 (40.0)*	4 (10.0)
ИЛ-10	7 (31.81)	7 (20.0)	8 (20.0)
ИЛ-12	2 (9.09)***	1 (2.85)***	28 (70.0)
ИЛ-18	12 (54.54)	18 (51.42)	12 (30.0)
ФНО- α	5 (22.72)***	12 (34.28)**	30 (75.0)

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$ (метод Манна-Уитни)

Сравнение цитокинового профиля у больных с локальным и генерализованным ГПА с учетом периода течения заболевания

Проводилось сравнение экспрессии генов цитокинов у больных с обострением локальной формы ГПА с цитокиновым профилем больных с ремиссией локального ГПА. Сравнение цитокинового профиля больных с обострением и ремиссией генерализованного ГПА также представлено в таб. 13.

Таблица 13

Частота выявления мРНК цитокинов у больных с локальным (обострение по сравнению с ремиссией) ГПА и генерализованным (обострение по сравнению с ремиссией) ГПА.

Цитокин	Локальный ГПА (n=22)		P	Генерализованный ГПА (n=35)		P
	Обострение ГПА (n=9)	Ремиссия ГПА (n=13)		Обострение ГПА (n=20)	Ремиссия ГПА (n=15)	
ИФН-α	5 (55.56)	3 (23.08)	0.81	9 (45.00)	6 (40.00)	0.22
ИФН-γ	2 (22.22)	0	0.36	3 (15.00)	5 (33.33)	0.40
ИЛ-1β	5 (55.56)	6 (46.15)	0.51	8 (40.00)	8 (53.33)	0.73
ИЛ-2	1 (11.11)	1 (7.69)	0.81	3 (15.00)	3 (20.00)	0.92
ИЛ-4	0	1 (7.69)	0.94	1 (5.00)	1 (6.67)	0.72
ИЛ-6	1 (11.11)	3 (23.08)	0.75	8 (40.00)	5 (33.33)	0.66
ИЛ-8	5 (55.56)	6 (46.15)	0.57	9 (45.00)	5 (33.33)	0.73
ИЛ-10	3 (33.33)	4 (30.77)	0.98	4 (20.00)	3 (20.00)	0.94
ИЛ-12	1 (11.11)	1 (7.69)	0.81	1 (5.00)	0	0.92
ИЛ-18	7 (77.78)	5 (38.46)	0.32	12 (60.00)	6 (40.00)	0.13
ФНО-α	3 (33.33)	2 (15.39)	0.94	7 (35.00)	5 (33.33)	0.50

(метод Манна- Уитни)

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 определено достоверных отличий в экспрессии генов исследуемых цитокинов у больных с обострением генерализованного ГПА с цитокиновым профилем больных с ремиссией генерализованного ГПА.

3.2.2. 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 отмечается 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. (таб. 14)

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 (2.5)
ИФН- γ	5 (17.24)	5 (17.85)	12 (30.0)
ИЛ-1 β	13 (44.82)	14 (50,0)	14 (35.0)
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 (20.0)
ИЛ-8	14 (48.27)**	11 (39.28)*	4 (10.0)
ИЛ-10	7 (24.13)	7 (25.0)	8 (20.0)
ИЛ-12	2 (6.89)***	1 (3.57)***	28 (70.0)
ИЛ-18	19 (65.51)*	11 (39.28)	12 (30.0)
ФНО- α	10 (34.48)**	7 (25.0)***	30 (75.0)

* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,001$ (метод Манна-Уитни)

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

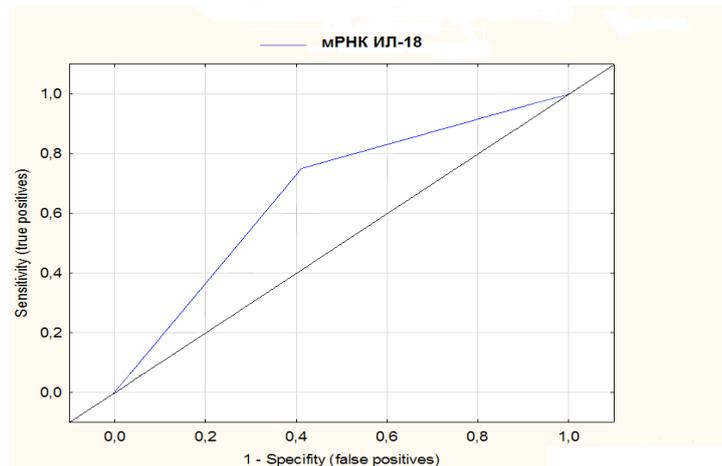


Рисунок 1. ROC-анализ. Чувствительность и специфичность определения мРНК ИЛ-18 в МПК у больных с обострением ГПА.

Площадь под кривой составила 0,67.

Проведенный ROC-анализ продемонстрировал, что чувствительность данного метода составляет - 75% , специфичность - 41%.

Клиническим примером изменения цитокинового профиля у больного ГПА, а также наличия дополнительного маркера обострения заолевания может служить данное клиническое наблюдение.

Больная М, 63 года. В январе 2012 года обратилась к врачу с жалобами на сильные головные боли, кровянистые выделения из носа, ежедневное повышение температуры тела до 37,2-37,5С. Наблюдалась у ЛОР врача по месту жительства. С мая 2012 года стала отмечать существенное затруднение носового дыхания, в связи с чем в сентябре 2012 года была госпитализирована в стационар. Пациентке выполнили септопластику и биопсию носа. По данным гистологического исследования определялись признаки некротизирующего васкулита и гранулематозного воспаления. Проводилась терапия преднизолоном 5 дней по 30 мг 2 раза в сутки с последующей полной отменой.

В январе 2013 отметила ухудшение самочувствия: усилились выделения из носа, появилась одышка при малейшей физической нагрузке. В феврале 2013 года консультирована в клинике Е.М. Тареева. По данным МСКТ гортани - КТ картина соответствует поражению гортани в рамках гранулематоза с полиангиитом (Вегенера). При лабораторном исследовании обращало на себя внимание повышение сАНЦА 7,4 Ед/мл(норма 0-5). Проводилась терапия глюкокортикостероидами с последующим постепенным снижением дозы до 3 табл./сут преднизолона. В связи с наличием клинико-лабораторной активности заболевания (поражение гортани, наличие одышки при малейшей физической нагрузке, повышение АНЦА) к терапии присоединен циклофосфан 600 мг в неделю с дальнейшим снижением до 400 мг/нед. Наблюдалась ревматологом в клинике.

В конце сентября 2013 пациентка вновь почувствовала себя хуже: усилилась слабость, вновь стали появляться корочки, периодически носовые кровотечения. Больная была госпитализирована в клинику. Определялась высокая активность заболевания в виде поражения ЛОР-органов (по данным МРТ пазух носа явления хронического экссудативного левостороннего гайморита с выраженной гипертрофией слизистой оболочки. Катаральные изменения слизистой оболочки правой гайморовой , решетчатой и левой лобной пазух), повышения АНЦА. Учитывая лейкопению и необходимость продолжения иммуносупрессивной терапии, ЦФА заменен на азатиоприн. Доза преднизолона оставлена прежней - 15 мг/сут. После выписки наблюдалась амбулаторно, доза азатиоприна была постепенно увеличена до 150 мг/сут с удовлетворительной переносимостью, преднизолон снижен до 5 мг/сут, Сохранялись гнойно-слизистые выделения носа, отхождение небольшого количества корочек.

Ухудшение с февраля 2014 года отметила ухудшение самочувствия: появились жалобы на кровянисто-гнойные выделения из полости носа, боль в мелких суставах кистей, голеностопных суставов (больше справа), одышку

при умеренной физической нагрузке. Госпитализирована в стационар: При обследовании обращало на себя внимание повышение СОЭ до 23 мм/ч (по Вестгрену). В общем анализе крови – лейкоциты – $3,1 \cdot 10^9$ /л, лимфоциты – 29%, моноциты – 4%, эозинофилы – 0%, базофилы – 0%, эритроциты – $4,15 \cdot 10^{12}$ /л, гемоглобин 144 г/л, гематокрит 35,3%, тромбоциты $174 \cdot 10^9$ /л. Анализ мочи по Нечипоренко - лейкоциты – 1250 (норма до 4000), эритроциты – 750 (норма до 1000), цилиндры – нет. Протеинурия отсутствует. РФ – отр, СРБ – отр, сАНЦА(ат к протеиназе 3) – 7,3 (норма 0-5)ЕД/мл , рАНЦА (Ат к миелопероксидазе) – 0,16 (норма 0-5)ЕД/мл. По данным КТ придаточных пазух носа определяются костные дефекты медиальной и верхней стенки левой верхнечелюстной пазухи, дефект и множественные участки костной деструкции носовой перегородки, стенок решетчатого лабиринта. Также определяются дефекты носовых раковин. Стенки пазух, в основном левой верхнечелюстной и левой лобной, выражено неравномерно утолщены, склерозированы, с неровными внутренними контурами. Полость левой верхнечелюстной пазухи уменьшена в размерах, заполнена патологическим субстратом. В правой верхнечелюстной пазухе, клетках решетчатого лабиринта определяются пристеночные утолщения слизистой. Часть левой лобной пазухи заполнена патологическим субстратом. Правая половина основной пазухи субтотально заполнена патологическим субстратом. Носовая перегородка S-образно искривлена. Слизистая носовых раковин утолщена. Заключение: поражение придаточных пазух носа и структур полости носа в рамках основного заболевания. По сравнению с КТ-изображениями от октября 2013 года отмечается умеренная отрицательная динамика в виде увеличения количества патологического содержимого в правой половине основной пазухи, некоторых клетках решетчатого лабиринта.

По данным осмотра невролога: множественная мононевропатия. Дистальная симметричная сенсо-моторная полинейропатия.

Учитывая лейкопению доза азатиоприна снижена до 100 мг/сут, в результате чего число лейкоцитов нормализовалось до $4,2 \cdot 10^9$ /л. В тоже время наличие признаков поражения нервной системы, активность процесса в ЛОР органах требуют продолжения иммуносупрессивной терапии и обсуждения биологической терапии.

За время госпитализации, больной М было выполнено дополнительное иммунологическое обследование:

Исследование цитокинового профиля методом ОТ-ПЦР у больной М. от 02.2014 г.:

Наличие мРНК (+): ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18

Отсутствие мРНК (-): ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ФНО- α

Исследования цитокинов данной больной М. отражают характерные изменения в экспрессии генов цитокинов, определяемых у больных ГПА: наличие экспрессии ИФН- α , ИЛ-8 и отсутствие экспрессии ИЛ-12 и ФНО-альфа. У больной С по данным клинико-лабораторного обследования определяется обострение ГПА (индекс BVAS = 3 балла) и также выявляется мРНК ИЛ-18. Согласно результатам нашего исследования, наличие экспрессии мРНК ИЛ-18 является дополнительным маркером активности процесса, что наряду с клинико-лабораторным признаками активности указывает на необходимость усиления иммуносупрессивной терапии и дополнительным показателем в пользу назначения биологической терапии (Ритуксимаб) для данной больной.

Исследование продукции цитокинов методом ИФА у больной М от 02.2014 (таб. 15).

**Исследование продукции цитокинов методом ИФА у больной М. в
феврале 2014 года.**

Цитокин	Значение	Норма [44]
ИФН- α	22.5	≤ 5
ИЛ-1 β	237.0	1-11
ИЛ-8	5.7	2-10
ИЛ-18	251.3	90-260
ФНО- α	5.1	1-6

У обследованной больной выявлено повышенное содержание ИФН- α и ИЛ-1 β в сыворотке крови. Показано, что наличие признаков васкулита достоверно коррелирует с уровнем сывороточного ИФН- α . Повышение содержания ИФН- α в сыворотке крови указывает на усиление неспецифических факторов иммунитета и способствует развитию признаков васкулита у данной больной. Значительное повышение содержания ИЛ-1 β (ключевого провоспалительного цитокина, главного медиатора развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа) в сыворотке крови указывает на активацию воспалительного ответа у обследованной пациентки. Комплексная клинико-лабораторная диагностика продемонстрировала необходимость усиления терапии данной больной. С учетом развития лейкопении на фоне приема ЦФА и азатиоприна, имеются указания для назначения биологической терапии данной пациентки.

Сравнение цитокинового профиля у больных с обострением и ремиссией ГПА с учетом формы распространения заболевания

Проводилось сравнение экспрессии генов цитокинов у больных с обострением локальной формы ГПА с цитокиновым профилем больных с обострением генерализованной формой ГПА. Сравнение цитокинового профиля больных с ремиссией локального и ремиссией генерализованного ГПА также представлено в таб. 16.

Таблица 16

Частота выявления мРНК цитокинов у больных с локальным (обострение по сравнению с ремиссией) ГПА и генерализованным (обострение по сравнению с ремиссией) ГПА.

Цитокин	Обострение ГПА (n=29)		P	Ремиссия ГПА (n=28)		P
	Локальный ГПА (n=9)	Генерализованный ГПА (n=20)		Локальный ГПА (n=13)	Генерализованный ГПА (n=15)	
ИФН-α	5 (55.56)	9 (45.00)	0.67	3 (23.08)	6 (40.00)	0.46
ИФН-γ	2 (22.22)	3 (15.00)	0.78	0	5 (33.33)	0.14
ИЛ-1β	5 (55.56)	8 (40.00)	0.52	6 (46.15)	8 (53.33)	0.77
ИЛ-2	1 (11.11)	3 (15.00)	0.88	1 (7.69)	3 (20.00)	0.60
ИЛ-4	0	1 (5.00)	0.85	1 (7.69)	1 (6.67)	0.98
ИЛ-6	1 (11.11)	8 (40.00)	0.23	3 (23.08)	5 (33.33)	0.66
ИЛ-8	5 (55.56)	9 (45.00)	0.67	6 (46.15)	5 (33.33)	0.58
ИЛ-10	3 (33.33)	4 (20.00)	0.58	4 (30.77)	3 (20.00)	0.64
ИЛ-12	1 (11.11)	1 (5.00)	0.81	1 (7.69)	0	0.75
ИЛ-18	7 (77.78)	12 (60.00)	0.47	5 (38.46)	6 (40.00)	0.96
ФНО-α	3 (33.33)	7 (35.00)	0.96	2 (15.38)	5 (33.33)	0.43

(метод Манна-Уитни)

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.

3.3 Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови больных ГПА

3.3.1 Оценка продукции цитокинов у больных ГПА, а также у больных имеющих признаки обострения или ремиссии заболевания.

У 40 из 60 больных ГПА дополнительно проводилось исследование содержания ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-18 и ФНО- α в сыворотке крови. Концентрацию цитокинов сравнивали с нормальными значениями, данными фирмой-производителем. 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 обнаруживался в повышенных концентрациях у 35% больных ГПА. Средние значения содержания в сыворотке крови ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ИЛ-18 превышали нормальные референсные значений. (таб. 17)

Количество больных N (%) с повышенным содержанием цитокина в сыворотке крови, а также среднее значение содержания цитокинов в сыворотке больных ГПА.

Цитокин	Количество больных с повышенным содержанием цитокина в сыворотке крови, N(%)	Среднее значение \pm стандартное отклонение	Референсные значения, данные фирмой-производителем, пг/мл [44]
ИФН- α	7 (17.50%)	9.59 \pm 11.58	\leq 5
ИЛ-1 β	20 (50.0%)	58.56 \pm 89.58	1-11
ИЛ-8	14 (35.0%)	14.15 \pm 32.23	2-10
ИЛ-18	18 (45.0%)	335.70 \pm 270.82	90-260
ФНО- α	6 (15.0%)	6.86 \pm 18.28	1-6

При изучении продукции цитокинов больных ГПА установлено, что уровни цитокинов у больных ГПА нарастают. 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 интерлейкина-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. (таб. 18, рис. 2)

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	1,0 \pm 0

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

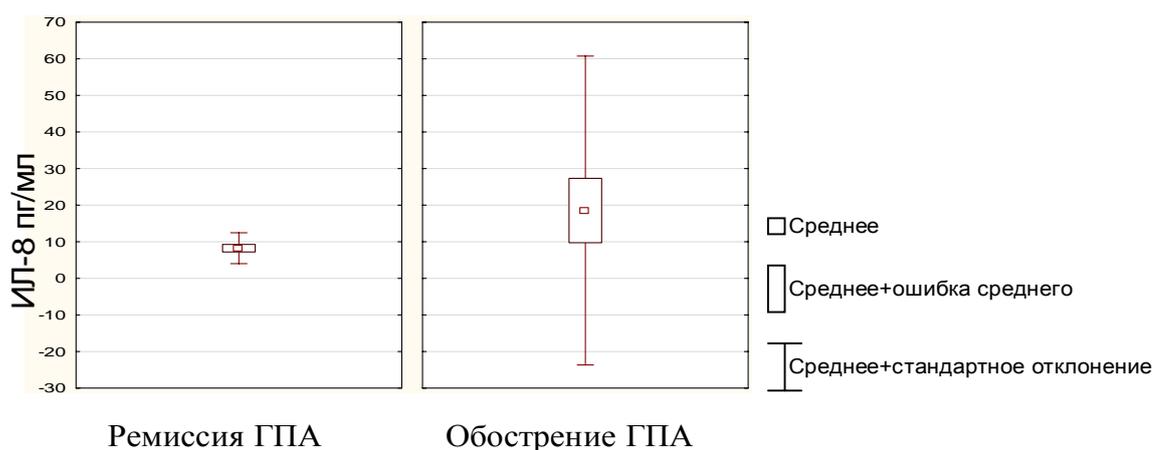


Рисунок 2. Уровень ИЛ-8 в сыворотке крови у больных с ремиссией и обострением ГПА.

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, таб. 19).

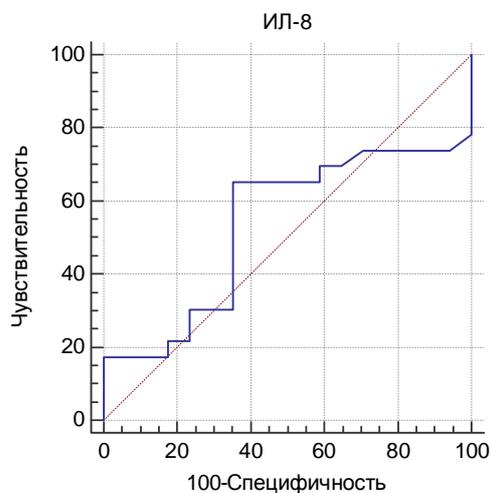


Рисунок 3. ROC - анализ. График чувствительности и специфичности определения ИЛ-8 в сыворотки крови у больных с обострением ГПА

Таблица 19

ROC-анализ. Чувствительность и специфичность определения ИЛ-8 в сыворотки крови у больных с обострением ГПА

Концентрация ИЛ-8 в сыворотке больных ГПА, пг/мл	Чувствительность	Специфичность
>5.7	65.22	41.18
>6.3	65.22	64.71
>9.4	30.43	64.71
>11.3	30.43	76.47

3.3.2 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. (таб. 20). У больных с генерализованной формой заболевания уровень ИЛ-18 достоверно выше ($p < 0,05$), чем у больных с локальной формой заболевания. (рис. 4)

Таблица 20

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).

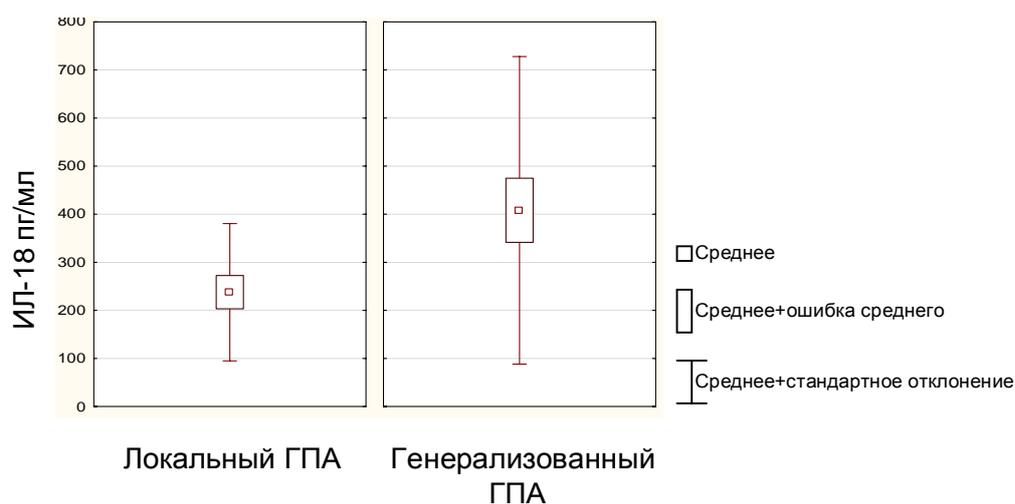


Рисунок 4. Уровень ИЛ-18 в сыворотке крови у больных с локальным и генерализованным ГПА.

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, таб. 21)

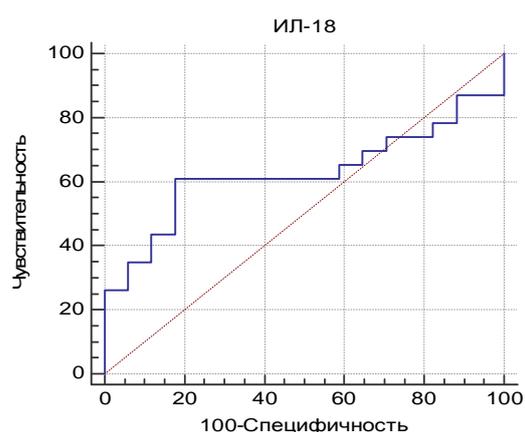


Рисунок 5. ROC-анализ. График чувствительности и специфичности определения ИЛ-18 в сыворотки крови у больных с генерализованной формой ГПА.

Чувствительность и специфичность определения ИЛ-18 в сыворотке крови у больных с генерализованной формой ГПА.

Концентрация ИЛ-18 в сыворотке больных ГПА, пг/мл	Чувствительность	Специфичность
>172,1	60.87	41.18
>258,5	60.87	82.35
>298,8	43.48	82.35
>331,2	43.48	88.24

3.4 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. 22.

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 васкулига	Признаки гранулематозного поражения	Поражение носа и ППН	Поражение органа слуха	Поражение глаз	Поражение гортани	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 (прямая сильная корреляция $r=0,74$) и ФНО- α (прямая средняя корреляционная зависимость $r=0,66$) в сыворотке крови больных ГПА.

Выявление признаков гранулематозного поражения имело статистически значимую прямую среднюю корреляционную зависимость с обнаружением мРНК ИЛ-18 ($r=0,63$) 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 (сильная обратная корреляционная связь, $r=-0,86$), а также с понижением уровня ИФН- α в сыворотки крови (сильная обратная корреляционная связь, $r=-0,68$). При поражении органа слуха у больных ГПА отмечалась статистически значимая полная обратная корреляционная зависимость с экспрессией мРНК ИЛ-12 ($r=-1,00$), а также слабая 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 (прямая полная корреляционная зависимость $r=1,00$) и повышением уровня ИЛ-18 в сыворотке крови (слабая прямая корреляционная связь $r=0,40$). При поражении гортани у больных ГПА были установлены статистически значимые обратные корреляционные зависимости с наличием экспрессии ИФН- γ (полная обратная связь $r=-1,00$), ИЛ-6 (средняя обратная связь $r=-0,57$), и уровнем продукции ИЛ-18 (средняя обратная связь $r=-0,55$).

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 ($r=0,41$) (умеренная прямая корреляционная зависимость), 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 (слабая обратная корреляционная связь, $r=-0,36$)

Дополнительное исследование корреляционных связей больных ГПА с поражением почек (имеющих как признаки обострения, так находящихся в ремиссии заболевания) установило, что снижение скорости клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин (нарушение функции почек) имело достоверную прямую среднюю корреляционную связь с наличием экспрессии мРНК ФНО- α ($r=0,45$), уровнем продукции ИЛ-8 ($r=0,38$) и ИЛ-18 ($r=0,41$). Также снижение СКФ менее 60 мл/мин было ассоциировано с обнаружением статистически значимой полной обратной корреляционной зависимости с уровнем сывороточного ИФН- α ($r=-1,00$).

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 мононуклеарах 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).

Примером наличия корреляционных связей между поражением различных органов и тканей и изменением цитокинов, а также исследования дополнительных маркеров активности болезни, наличия генерализованной формы ГПА может послужить следующее клиническое наблюдение.

Больная С, 54 года. С июля 2010 года стала отмечать появление заложенности носа с отделяемым в виде гнойно-кровянистых корочек. Наблюдалась с диагнозом затяжной ринит. При риноскопии определялся продуктивный процесс. Через 2 месяца от начала болезни присоединились заложенность в ушах, снижение слуха. Выставлен диагноз двусторонний отит. Проводились курсы антибактериальной терапии с последующим оперативным лечением. В результате проводимого лечения отмечалась слабopоложительная динамика: заложенность в ушах сохранялась, слух незначительно восстановился. В ноябре 2010 года присоединилось покраснение глаз, светобоязнь, диагностирован эписклерит.

В январе 2011 года – упорная лихорадка с максимальным подъемом температуры тела до 40 С, кашель в положении лежа, присоединился острый суставной синдром с поражением мелких суставов кистей, утренней скованностью, стал рецидивировать эписклерит, появились боли в правом глазу. При обследовании в стационаре выявлено повышение уровня азота мочевины до 10,1 мкмоль/л, креатинина до 1,62 мг/дл. При КТ пазух носа обращало на себя внимание наличие левостороннего кистозного

верхнечелюстного синусита, снижение пневматизации ячеек височных костей. КТ грудной клетки – увеличение внутригрудных лимфоузлов. При иммунологическом исследовании АЦЦП положительный (5,8 ЕД/мл). . В мае 2011 года - госпитализация в ревматологическое отделение: выявлено повышение уровня АНЦА до 10,5 ЕД/мл , положительный РФ, повышение уровня мочевины, креатинина до 1,49 мг/дл, протеинурия 0,3 г/л, при повторном КТ грудной клетки: в S9 правого легкого, субплеврально – участок снижения воздушности по типу «матового стекла», размерами 31-13-41 мм. Установлен диагноз гранулематоз с полиангиитом. Проведена пульс-терапия метил-преднизолоном (1000 мг №1, 500 мг №2, 250 №3), доза снижена в связи с плохой переносимостью, циклофосфамидом 800 мг №1, ГКС внутрь в дозе 30 мг/сут, циклофосфан 400 мг/нед в/м. На фоне лечения купировался эписклерит, лабораторно отмечалось снижение уровня креатинина до 1,2 мг/дл, несколько уменьшилась протеинурия. В декабре 2011 года отмечалось нарастание уровня креатинина до 1,76 мг/дл, протеинурии до 0,4 г/л, возобновились корочки в носу, возобновлен прием циклофосфана 400 мг/нед в/м, проведена пульс терапия ЦФА 1000 мг , метипредом 500 мг №3.

В июне 2012 года впервые консультирована в клинике Е.М. Тареева. Жалобы на одышку, слабость, отеки ног, геморрагии на коже рук, ног. Лабораторно: лейкоц 8,6, СОЭ 31 мм/ч, гемоглобин 115 г/л, протеинурия 0,17 г/л, креатинин 109 мкмоль/л Назначен ЦФА 800 мг/нед внутрь, ПЗ 12 мг/сут. Повторная госпитализация в октябре 2012 года – ремиссия. В сентябре 2013 года - СОЭ, АНЦА в норме, уровень креатинина 1,2 мг/дл, консультирована ЛОР-врачом – без признаков активности, КТ придаточных пазух – без признаков активности. Снижена доза ЦФА до 40 мг/сут. ПЗ 10 мг/сут.

При повторной госпитализации в мае 2014 года признаков активности болезни не выявлено: лабораторных (лейкоциты $5,4 \cdot 10^9/\text{л}$, СОЭ 16 мм/ч, гемоглобин 112 г/л, протеинурия отсутствует, эритроцитов – нет, креатинин

1,1 мг/дл, сАНЦА- 0,45 Ед/мл), клинических (умеренный кашель), рентгенологических (по данным рентгенографии пазух носа, амбулаторно выполненное КТ легких – без отрицательной динамики).

Таким образом, у пациента с ГПА с поражением легких (участки по типу «матового стекла»), верхних дыхательных путей (язвенно-некротический ринит), органа слуха (двусторонний отит, смешанная тугоухость), почек (ХБП 2 ст.), в анамнезе поражение глаз (рецидивирующий эписклерит), суставов, АНЦА+, своевременная диагностика заболевания и адекватная иммуносупрессивная терапия позволили достичь длительной ремиссии ГПА.

За время госпитализации, больной С. было выполнено дополнительное иммунологическое обследование:

Исследование цитокинового профиля методом ОТ-ПЦР у больной С от 05.2014 г.

Наличие мРНК (+): ИЛ-1 β , ИЛ-2, ФНО- α

Отсутствие мРНК (-):ИФН- α ,ИФН- γ ,ИЛ-4,ИЛ-6,ИЛ-8,ИЛ-10,ИЛ-12,ИЛ-18.

Исследование продукции цитокинов методом ИФА у больной С от 05.2014 г. (таб. 23)

Исследование продукции цитокинов методом ИФА у больной С.

Цитокин	Значение, пг/мл	Норма, пг/мл
ИФН α	0	≤ 5
ИЛ-1 β	5.1	1-11
ИЛ-8	5.2	2-10
ИЛ-18	344.2	90-260
ФНО- α	0	1-6

Исследование цитокинового профиля данной больной выявило повышение экспрессии мРНК ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ФНО- α в МПК. Также отмечено повышение концентрации сывороточного ИЛ-18 (таблица 23).

Проведенное подробное клиническое, лабораторное обследование больной С., отсутствие экспрессии мРНК ИЛ-18 в МПК указывает на отсутствие активности ГПА у данной больной. Пациентка С. страдает генерализованным ГПА с поражением легких и почек и у неё обнаружено повышение уровня сывороточного ИЛ-18 до 344,2 пг/мл (дополнительный показатель наличия генерализованной формы ГПА). Высокий уровень ИЛ-18 в сыворотки крови, наиболее вероятно, связан с высокой выработкой данного цитокина макрофагами (основными клетками продуцентами ИЛ-18). ИЛ-18 является провоспалительным цитокином и обладает широким спектром биологической активности (индуктор образования ИФН- γ и развития Th1 типа иммунного ответа, активация ЕК, стимуляция продукции многих цитокинов - ФНО- α , ИЛ-1 β (определяется у Больной С.) и др). При отсутствии экспрессии ИЛ-12 (что наблюдается у пациентки С.), ИЛ-18 вместе с ИЛ-2 индуцирует выработку ИЛ-4, что способствует развитию Th2-типа иммунного ответа. Таким образом высокий уровень ИЛ-18 в сыворотке крови больной С. является показателем возможности реализации основных

эффектов данно цитокина, что наряду с оценкой клинико-лабораторных исследований указывает на необходимость сохранения поддерживающей терапии в прежнем объеме. Поражение легких у больной С. проявляется обнаружение участков по типу матового стекла и сопровождается наличием высокого сывороточного ИЛ-18 (имеется достоверная корреляция между уровнем указанного цитокина и наличием поражения легких у больных ГПА). Поражение почек достоверно коррелирует с понижением экспрессии мРНК ИФН- α . Клиническим примером данного заключения являются показатели, определяемые у больной С.: мРНК ИФН- α не определяется, имеется поражение почек в рамках ГПА (ХБП 2 ст.). Экспрессии мРНК ФНО- α достоверно коррелирует с наличием поражения легких и почек, как у обследованной больной, что указывает на участие данного цитокина в поражении легких и почек пациентки.

Помимо наличия вовлечения легких и почек, у больной С. определяется поражение верхних дыхательных путей (язвенно-некротический ринит), которое ассоциировано с понижением экспрессии мРНК ИЛ-4 и мРНК ИЛ-12, а также с понижением уровня ИФН- α в сыворотки крови. Поражение органа слуха (двусторонний отит, смешанная тугоухость) у больной С сопровождается отсутствием экспрессии мРНК ИЛ-12. Данные корреляционные связи были достоверно подтверждены в корреляционном исследовании.

3.5 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.

При динамическом наблюдении, у 3 из 12 больных с обострением ГПА установлено ухудшение состояния ЛОР органов, у 1 больного - ухудшение состояния органа зрения, у 7 больных отмечено появление новых очагово-инфильтративных изменений в легких, у 1 больного была зафиксирована отрицательная динамика как со стороны ЛОР органов, так и со стороны легких (выявлены новые очаги в легких). Клиническая характеристика больных, прошедших динамическое наблюдение представлено в таб. 24.

**Частота развития поражений органов у больных ГПА при
первичном и динамическом обследовании.**

	Первоначальное обследование, N (%)	Динамическое наблюдение, N(%)
Генерализованный ГПА	25 (59.5)	27 (64.3)
Локальный ГПА	17 (40.5)	15 (34,9)
Поражение носа и ППН	39 (92.9)	39 (92.9)
Поражение органа слуха	22 (52.4)	22 (52.4)
Поражение органа зрения	24 (57.1)	24 (57.1)
Поражение легких	22 (52.4)	24 (57.1)
Поражение почек	19 (45.2)	19 (45.2)

В течение года, у 2-х пациентов, изначально имеющих локальную форму ГПА образовались очагово-инфильтративные изменения в легких, соответствующие генерализованной форме ГПА. 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 мофетиллом - 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 повышение индекса BVAS не определялось.

Выполнен статистический анализ с использованием метода отношения шансов. (таб. 25). Обнаружение экспрессии мРНК цитокинов у больных ГПА расценивалось как наличие фактора риска, отсутствие экспрессии мРНК цитокина - как отсутствие фактора риска.

Таблица 25

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 использованием метода ИФА.

У 28 из 42 больных ГПА, при первичном обследовании, проведен иммуноферментный анализ (ИФА) с целью оценки содержания цитокинов в сыворотке 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. (таб. 26).

Таблица 26

Межквартильный размах, среднее содержание цитокинов в сыворотке крови больных с наличием и отсутствием отрицательной динамики ГПА.

Цитокин	Среднее содержание и межквартильный размах цитокинов, у больных с отсутствием отрицательной динамикой ГПА, пг/мл (n=19)	Среднее содержание и межквартильный размах цитокинов, у больных с отрицательной динамикой ГПА, пг/мл (n=9)
ИФН- α	12.0 [5.0-22.4]	5.0 [5.0-5.0]
ИЛ-1 β	72.2 [5.0-117.3]	36.5 [5.1-19.7]
ИЛ-8	7.7 [4.6-9.4]	8.1 [5.4-12.0]
ИЛ-18	305.3 [150.3-352.7]	416.1 [163.3-708.7]
ФНО- α	7.7 [1.0-5.1]	1.0 [1.0-1.0]

У больных с отрицательной динамикой ГПА в течение года отмечалась тенденция к уменьшению среднего содержания ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8 и увеличение среднего содержания ИЛ-18 и ФНО- α .

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. (таб. 27)

Таблица 27

Количество больных N (%) с наличием или отсутствием фактора риска.

Цитокин	Количество больных с отрицательной динамикой ГПА в течение года (n=9)		Количество больных с отсутствием отрицательной динамики ГПА в течение года (n=19)	
	Наличие фактора риска, n (%)	Отсутствие фактора риска, n (%)	Наличие фактора риска, n (%)	Отсутствие фактора риска, n (%)
ИФН- α	9 (100%)	0	13 (68.4%)	6 (31.6%)
ИЛ-1 β	5 (55.5%)	4 (44.4%)	3 (15.8%)	16 (84.2%)
ИЛ-8	6 (66.7%)	3 (33.3%)	9 (47.4%)	10 (52.6%)
ИЛ-18	7 (77.7%)	2 (22.2%)	10 (52.6%)	9 (47.4%)
ФНО- α	9 (100%)	0	14 (73.7%)	5 (26.3%)

Выполнен статистический анализ с использованием метода отношения шансов. (таб. 28)

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.

Глава 4. Заключение:

Экспрессия генов цитокинов, как и других белков, осуществляется в несколько этапов: транскрипция, процессинг мРНК, трансляция, процессинг белка и секреция белка. Каждый этап экспрессии генов цитокинов может регулироваться, поэтому важно знать не только уровень продукции медиатора, но и характеристики других этапов экспрессии гена. В проведенном исследовании проводилось изучение цитокинов на нескольких этапах: на этапе транскрипции (методом ОТ-ПЦР) и на этапе продукции цитокина (метод ИФА). Качественное определение мРНК с использованием ОТ-ПЦР представляет собой скрининговый метод, который позволяет изучить изменение транскрипции достаточно широкого спектра цитокинов. [84] Исследование мРНК цитокинов в мононуклеарах периферической крови позволяет определить, экспрессия каких цитокинов активирована именно в данных клетках (мононуклеарах периферической крови) у больных ГПА.

Проанализировав, транскрипция каких цитокинов у больных ГПА достоверно изменяется по сравнению со здоровыми добровольцами, проводилась последующая оценка содержания цитокинов в сыворотки крови, что позволило оценить конечный этап синтеза цитокинов у обследованных больных.

Цитокиновый профиль у больных с локальным и генерализованным ГПА

Проведенное исследование продемонстрировало наличие статистически достоверной ($p < 0,05$) активации экспрессии генов ИФН- α , ИЛ-8 и подавления экспрессии генов ИЛ-12, ФНО- α при сравнении больных локальной формой ГПА с группой контроля и при сравнении больных генерализованной формой ГПА с группой контроля. При сопоставлении цитокинового профиля больных локальной формой ГПА с данными больных генерализованной формой ГПА статистически значимых изменений в экспрессии генов исследуемых цитокинов обнаружено также не было.

В нашем исследовании показано что при различных формах ГПА цитокиновый профиль в МПК одинаковый, что может указывать на однонаправленный характер участия данных типов клеток (мононуклеаров периферической крови) в процессе развития ГПА независимо от формы.

На выработку интерферонов и интерлейкинов могут оказывать влияние другие цитокины, которые вырабатываются локально, в очаге воспаления, а также цитокины, вырабатываемые другими клетками-продуцентами.[28,31,33] Цитокиновый профиль, определяемый в системном кровотоке при различных формах ГПА, может отличаться от выработки цитокинов в тканях различных органов и систем больных ГПА. Таким образом, указанных биологически активных веществ, и также выработки цитокинов другими клетками-продуцентами может быть оправдано для совершенствования знаний патогенеза ГПА.

Цитокиновый профиль у больных с обострением и ремиссией ГПА

При анализе цитокинового профиля больных с обострением и ремиссией ГПА было выявлено, что при сравнении этих групп с группой контроля отмечается 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.

ИЛ-18 представляет собой провоспалительный цитокин, который относится к семейству интерлейкина 1. ИЛ-18 обладает плеiotропными эффектами в отношении многих типов клеток и влияет на секрецию различных по своей функциональной направленности медиаторов. Есть данные как о про-, так и противовоспалительной активности ИЛ-18. ИЛ-18 сдвигает баланс цитокинов в пользу клеточного иммунитета, стимулируя продукцию ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2.[34]. С другой стороны, существуют данные о том, что ИЛ-18 индуцирует созревание наивных CD4+ лимфоцитов

в ИЛ-4 продуцирующие клетки *in vitro* [85]. Также ИЛ-18 вырабатывается макрофагами. Повышение его содержания может говорить об активации макрофагального звена иммунитета.[34] В 2009 году Novick и соавторы отметили, что повышение уровня ИЛ-18 и ИЛ-18 связывающего белка у больных с обострением ГПА может давать основания предположить, что данные маркеры играют определенную роль в патогенезе и течение ГПА. [43]

В нашем исследовании была установлена достоверная прямая корреляционная зависимость между наличием АНЦА и обнаружением мРНК ИЛ-18 (0,48). Известно, что АНЦА играют одну из ключевых ролей в патогенезе ГПА [24] Выявление достоверной прямой корреляционной связи между наличием с АНЦА и обнаружением мРНК ИЛ-18 является дополнительным указанием на участие данного цитокина в патогенезе ГПА.

Для оценки клинической значимости определение мРНК ИЛ-18 в МПК как маркера обострения ГПА был проведен ROC-анализ. Площадь под кривой составила 0,67, что говорит об удовлетворительном качестве клинической значимости теста с чувствительностью данного метода - 75% , специфичностью - 41%.

Таким образом, определение мРНК ИЛ-18 в МПК может быть использовано как дополнительный маркер активности ГПА и указывает на участие данного цитокина в патогенезе заболевания.

Продукция цитокинов у больных ГПА

Проанализировав, транскрипция каких цитокинов у больных ГПА достоверно изменяется по сравнению со здоровыми, проводилась последующая оценка конечного этапа синтеза белка - продукции цитокинов с использованием метода иммуноферментного анализа. Учитывая достоверное изменение транскрипции мРНК ИФН- α , ИЛ-8, ФНО- α и ИЛ-18 (при обострении ГПА) в МПК у обследованных больных по сравнению со

здоровыми добровольцами, оценка содержания указанных цитокинов в сыворотке крови может предположить участие активированных периферических мононуклеаров и исследуемых цитокинов в патогенезе ГПА.

Дополнительно проводилась оценка продукции ИЛ-1 β - главного медиатора развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа.[28] Изучение изменения концентрации ИЛ-1 β у больных ГПА представляет особый интерес в связи с развитием некротизирующего васкулита - воспалительной реакции в стенке сосудов.

ИФН- α проявляет неспецифическую противовирусную активность.[33] ИФН- α может активировать естественные киллеры (ЕК) и цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ).[86] При выраженной стимуляции продукции ИФН- α отмечается снижение продукции ИЛ-12 и ИФН- γ НК-клетками.[31]

Исследование экспрессии генов цитокинов в периферических мононуклеарах (в состав которых входят моноциты и лимфоциты, в том числе НК-клетки) показало, что у больных ГПА угнетается синтез мРНК ИЛ-12 и ИФН- γ . Таким образом, исходя из полученных нами результатов, у больных ГПА можно было бы предположить непосредственное участие периферических мононуклеаров в патогенезе ГПА в виде активации цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) и развития НК-клеточной цитотоксичности у данных больных. Однако, невысокий процент больных ГПА (17,5%) с повышенным содержанием ИФН- α в сыворотке крови, не дает возможность однозначно утверждать о развитии данного типа иммунного ответа.

Оценка синтеза мРНК ИФН- α в периферических мононуклеарах больных ГПА в нашем исследовании выявила достоверное снижение экспрессии гена данного цитокина по сравнению со здоровыми добровольцами. Последующая оценка продукции ИФН- α также

продемонстрировала, что данный цитокин повышался только у 6 (15%) обследованных больных.

При проведении двойного-слепого плацебо-контролируемого исследования с использованием конкурентного ингибитора связывания ФНО- α (этанерцепта) у больных ГПА было показано, что использование данного препарата не повлияло на частоту достижения длительной ремиссии у больных ГПА [40,71]

В опытах показано, что ФНО- α индуцирует экспрессию протеиназы 3 на поверхности полиморфноядерных лейкоцитов у больных ГПА.[47] Известно, что активированные моноциты представляют собой основной источник ФНО- α . [87] Влияние ФНО-альфа на индукцию экспрессии протеиназы 3 на поверхности нейтрофилов[47], достоверное снижение экспрессии гена данного цитокина по сравнению со здоровыми добровольцами, незначительная продукция ФНО-альфа в сыворотке крови больных ГПА и отсутствие эффекта от проводимой анти-ФНО-альфа терапии с применением этанерцепта [15] указывает на неоднозначную роль данного цитокина в патогенезе ГПА, требующую дальнейшего изучения.

ИЛ-1 β является главным медиатором развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма [28,31,33]. в связи с этим обнаружение повышенного содержания ИЛ-1 β в сыворотки крови у 20(50%) больных ГПА представляет особый интерес.

За счет конститутивной экспрессии своих рецепторов ИЛ-1 β очень быстро активирует практически все типы клеток, участвующих в формировании локальной воспалительной реакции, включая фибробласты, эндотелий, резидентные макрофаги и все типы лейкоцитов крови. ИЛ-1 β участвует в регуляции функций эндотелия и системы свертывания крови, индуцируя прокоагулянтную активность. [33] ИЛ-1 β образуется моноцитами, макрофагами, дендритными клетками, астроцитами, фибробластами, НК-

клетками, кератиноцитами и эндотелиальными клетками. Усиливает функцию нейтрофилов и НК.[28] В работе Borgmann и соавторов выявлено, что пациенты страдающие васкулитом, имеющие АТ к протеиназе 3 и поражение почек, обладают повышенным риском развития терминальной стадии почечной недостаточности при обнаружении высокой секреции провоспалительного ИЛ-1 β и низкой секреции антагониста рецептора ИЛ-1 β .[88] Учитывая, что у больных ГПА ИЛ-1 β может влиять на хемотаксис нейтрофилов в БАЛ [41], на прогрессирование почечной недостаточности[88] и его повышенная концентрация в сыворотке определяется у 50% больных ГПА по данным нашего исследования, можно предположить, что данный цитокин является непосредственным участником патогенеза ГПА.

Продукция ИЛ-8 у больных с обострением ГПА.

ИЛ-8– хемотаксический воспалительный цитокин, который является также активатором нейтрофилов. ИЛ-8 вызывает хемотаксис нейтрофилов, базофилов и некоторых субпопуляций Т-лимфоцитов в очаг воспаления. Он способен повышать адгезивность нейтрофилов и вызвать повышение экспрессии молекулы адгезии-1. ИЛ-8 стимулирует транслокацию протеиназы 3 на поверхность нейтрофилов, тем самым обеспечивая большую вероятность связывания протеиназы 3 с АНЦА. [63,64] Известно, что АНЦА стимулируют выработку ИЛ-8 как моноцитами, так и нейтрофилами.[57,62]

Выявленное достоверное повышение экспрессии гена ИЛ-8 по сравнению со здоровыми добровольцами подтверждает, что у больных ГПА стимулирована выработка данного цитокина в периферических мононуклеарах. У 14 (35%) обследованных больных определяется повышенная концентрация ИЛ-8 в сыворотки крови. В предыдущих исследованиях также отмечается повышение уровня хемокинов, вызывающих нейтрофилию, в сыворотке больных ГПА и повышение СХС хемокинового лиганда (СХСЛ8) в клубочках почек больных с обострением ГПА.[27,57] Описано что, ИЛ-8 коррелирует с активностью заболевания[40],

кроме того данный цитокин обнаруживается в повышенных концентрациях у больных как с обострением, так и с ремиссией ГПА.[41] Проведенное нами исследование выявило, что в сыворотке больных с обострением ГПА достоверно чаще определялось повышение содержания ИЛ-8 по сравнению с больными в ремиссии заболевания. Учитывая полученные данные, а также наличие стимуляции выработки данного цитокина в МПК больных ГПА, можно предположить, что ИЛ-8 является важным участником патогенеза ГПА, а также играет роль в развитии обострения данного заболевания. Использование определения концентрации ИЛ-8 в сыворотке крови в качестве дополнительного маркера обострения ГПА обладает невысокой чувствительностью и специфичностью.

Продукция ИЛ-18 у больных генерализованной формой ГПА.

ИЛ-18 участвует в процессе инфильтрации тканей иммунокомпетентными клетками, стимулируя экспрессию молекул адгезии. [89,90] ИЛ-18 - провоспалительный цитокин, обладающий плеiotропными эффектами. Основным эффектом ИЛ-18 - это индукция продукции ИФН- γ Т и НК клетками, что приводит к активации Th1 типа иммунного ответа. Помимо безусловного влияния на развитие Th1, ИЛ-18 также принимает участие в развитии Th2 типа иммунного ответа, является стимулятором молекул адгезии.[34]

При анализе продукции ИЛ-18, в сыворотке крови больных ГПА определяется повышенная концентрация данного цитокина у 18(45%) обследованных больных. У пациентов, имеющих генерализованную форму ГПА, достоверно выше содержание ИЛ-18 в сыворотке крови по сравнению с пациентами с локальной формой ГПА. Для определения возможности использовать ИЛ-18 в качестве биомаркера наличия генерализованной формы ГПА, был проведен ROC анализ и определена чувствительность и специфичность данного биомаркера для различных концентраций. Оптимальные значения чувствительности и специфичности метода выявлены

при концентрации ИЛ-18 более 258,5 пг/мл и составили– 60,9 и 82,4%, соответственно. Площадь под ROC-кривой составляет 0,627 - показатель, характеризующий хорошее качество модели диагностического теста, однако обладающего высокой специфичностью. Полученные данные демонстрируют, что исследование содержания ИЛ-18 в сыворотке крови больных ГПА можно использовать для дополнительной диагностики генерализованной ГПА.

Исследование факторов риска обострения ГПА в течение одного года

С использованием метода отношения шансов, определено, что 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.

Известно, что ИЛ-1 β относится к ключевым провоспалительным цитокинам, является главным медиатором развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма.[1] ИЛ-1 инициирует и регулирует воспалительные, иммунные процессы, активирует нейтрофилы, естественные киллеры, Т- и В-лимфоциты, стимулирует синтез белков острой фазы, цитокинов, молекул адгезии, простагландинов. Повышает хемотаксис, фагоцитоз, гемопоз, проницаемость сосудистой стенки. Запускает реакции воспалительно-регуляторного каскада, стимулирует синтез коллагена. Играет важную роль в развитии местного воспалительного процесса.[91] Участие ИЛ-1 β в реакции воспаления определено его высокой тропностью к нейтрофилам, базофилам, эндотелиоцитам. Это составляет основу местного (аутокринного и паракринного), а также системного гуморального действия. При действии ИЛ-1 β увеличивается пул моноцитов и нейтрофилов в крови и очагах воспаления [92]. Нейтрофилы при действии ИЛ-1 β запускают реакцию респираторного взрыва и усиливают синтез активных форм кислорода.[93,94] ИЛ-1 β активирует пролиферацию сенсibilизированных антигеном Т и В-лимфоцитов.[32].

В ходе развития адекватного клеточного иммунного ответа у здорового человека необходима стимуляция синтеза его главных медиаторов — ИФН- γ и провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-1 β . [95] Однако в работе Lamprecht и соавторов было показано, что у больных ГПА определяются глубокие изменения Т-клеточного иммунного ответа, включая Th1-типа иммунного ответа. Обнаруживаются аномальные Т-клетки экспрессирующие на своей поверхности ЕК-подобные рецепторы. Авторы утверждают, что нарушение регуляторных Т-клеток и изменение Т-клеточного иммунного ответа у больных ГПА может способствовать формированию гранулем и аутоиммунитета. [96]

При снижении стимуляции синтеза ИЛ-1 β у больных ГПА, вероятно, создаются условия для развития изменений в Т-клеточном иммунном ответе. и может способствовать развитию обострения заболевания в течение года.

По данным проведенного обследования выявлено, что среднее значение сывороточного ИЛ-1 β у больных с отрицательной динамикой ГПА в течение одного года составляет 36,5 пг/мл. Среднее значение ИЛ-1 у больных с отсутствием обострения ГПА в течение одного года составляло 72,2 пг/мл. Отмечается тенденция у уменьшению сывороточного ИЛ-1 β у больных с отрицательной динамикой заболевания в течение года. Содержание ИЛ-1 β у здорового человека составляет от 1 до 11 пг/мл в в сыворотке крови [97]. Диапазон значений от 5,1 до 19,7 пг/мл, определяемый как фактор риска развития отрицательной динамики ГПА, незначительно превышает показатели, определяемые у здорового человека. Проведенное исследование указывает на то, что у больных с отрицательной динамикой ГПА в течение года имеется снижение стимуляции синтеза ИЛ-1 β , что вероятно, создает условия для развития изменений в Т-клеточном иммунном ответе и может способствовать обострению заболевания в течение года.

Корреляция между клиническими данными и данными исследования цитокинов у больных ГПА

У больных, имеющих признаки васкулита, имеется достоверная прямая корреляционная зависимость с сывороточными уровнями ФНО- α (0,82), ИФН- α (0,67). Ключевое значение в некротизирующем повреждении сосудистой стенки имеют АНЦА, напрямую воздействующие на нейтрофилы и моноциты посредством связывания с антигенами (ПРЗ, МПО), экспрессированными на поверхности клеточной мембраны. [98]

В опытах *in vitro* показано, что ФНО- α индуцирует экспрессию протеиназы 3 на поверхности полиморфноядерных лейкоцитов у больных ГПА. АНЦА вызывают активацию нейтрофилов в пределах сосудистого эндотелия с высвобождением кислородных радикалов, протеолитических ферментов, хемокинов, увеличивают цитотоксичность нейтрофилов в отношении эндотелиальных клеток и повышают экспрессию молекул адгезии, способствуя трансэндотелиальной миграции активированных нейтрофилов, вызывают нарушения апоптоза нейтрофилов, стимулируют пролиферацию Т-лимфоцитов.[47] Таким образом, наличие сильной прямой корреляционной зависимости между наличием признаков васкулита и сывороточным уровнем ФНО- α подтверждает участие ФНО- α в патогенезе васкулита у больных ГПА.

Интерфероны оказывают множество эффектов на иммунную систему и могут индуцировать или ингибировать течение аутоиммунного заболевания. ИФН- α проявляет неспецифическую противовирусную активность.[33] ИФН- α может активировать естественные киллеры (NK) и цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ).[86] По результатам исследования Клара и соавторов показано, что при ГПА нарушается функционирование Т-регуляторных лимфоцитов, предположительно активируемых аутоантителами к протеиназе-3 в сочетании с α - интерфероном.[99] Наличие достоверной прямой корреляционной зависимости может указывать на то, что развитие

признаков васкулита может быть ассоциировано с изменением функционирования Т-регуляторных лимфоцитов, активацией естественных киллеров и ЦТЛ.

Макрофаги и нейтрофилы, активированный микробными продуктами, начинают продуцировать цитокины и другие биологически активные медиаторы, в том числе интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12), ФНО- α , простагландины и лейкотриены.[32] Обнаружение прямой корреляционной зависимости между наличием признаков васкулита и продукцией ИФН- α и ФНО- α , можно предположить, что в развитии васкулита у больных ГПА обусловлено, в том числе активацией макрофагального звена иммунитета в патогенезе ГПА.

У больных с признаками гранулематозного воспаления выявлена достоверная обратная корреляционная зависимость с уровнем экспрессии гена ИЛ-4 (-0,73) и ИЛ-10 (-0,48), а также достоверная прямая корреляционная зависимость с уровнем экспрессии гена ИЛ-18 (0,63).

ИЛ 4 продуцируется Th2 лимфоцитами, тучными клетками и стромальными клетками костного мозга. Стимулирует дифференцировку Th0 в Th2 и синтез иммуноглобулинов В –лимфоцитами. Подавляет генерацию цитотоксических лимфоцитов, НК, а также продукцию ИФН- γ и противоопухолевую активность макрофагов. ИЛ-4 способствует развитию Th2 типа иммунного ответа. Является противовоспалительным цитокином.[28,31,33]

Выраженным противовоспалительным эффектом также обладает ИЛ-10. ИЛ-10 подавляет синтез цитокинов Т-клетками, снижает активность макрофагов, уменьшает продукцию воспалительных цитокинов. Его действие противоположно действию основных цитокинов. Он снижает образование интерферонов, фактора некроза опухоли и ИЛ-6, ИЛ-1. Стимулирует этот цитокин синтез IgE. ИЛ-10 участвует в гуморальном компоненте иммунного

ответа, отвечая за аллергическую настроенность организма и антипаразитарную защиту. Стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов, тимоцитов и тучных клеток. Подавляет синтез ИЛ-2 и ИФН- γ клетками Th1, угнетает клеточный иммунный ответ, продукцию провоспалительных цитокинов[31,32,33].

ИЛ-18 представляет собой провоспалительный цитокин, который относится к семейству Интерлейкина 1. ИЛ-18 обладает плеiotропными эффектами в отношении многих типов клеток и влияет на секрецию различных по своей функциональной направленности медиаторов. Есть данные как о про-, так и противовоспалительной активности ИЛ-18. ИЛ-18 сдвигает баланс цитокинов в пользу клеточного иммунитета, стимулируя продукцию ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2. С другой стороны, существуют данные о том, что ИЛ-18 индуцирует созревание наивных CD4+ лимфоцитов в ИЛ-4 продуцирующие клетки *in vitro*. Также ИЛ-18 вырабатывается макрофагами. Повышение его содержания может говорить об активации макрофагального звена иммунитета. [34]

Гранулематозное воспаление при ГПА содержит в себе клетки, которые дифференцируются из моноцитарно-макрофагальной клеточной линии, а именно макрофаги, дендритные клетки, эпителиоидные клетки и многоядерные гигантские клетки (моноцитарного ряда дифференцировки). Т-эффекторные клетки памяти инициируют формирование гранулемы. Гранулемы обеспечивают формирование воспалительного микроокружения, которое поддерживает воспаление и может способствовать нарушению иммунологической толерантности. Гранулема является источником провоспалительных цитокинов и аутоантител. Т-клетки, обнаруженные в гранулемах, в основном демонстрируют развитие Th1-тип продукции цитокинов, с секрецией ИФН- γ и ФНО- α . Последние сообщения показывают, что протеиназа 3 вызывает сильный Th-1 ответ с помощью созревания дендритных клеток и последующей презентацией антигена Т-клеткам. Так

как формирование гранулемы обеспечивается за счет Th1 ответа, созревание дендритных клеток и активация патологических путей может быть важно в патогенезе заболевания. АНЦА продуцируются В-летками, расположенными в гранулеме, и связывается с нейтрофилами, которые экспрессируют протеиназу 3 на их поверхности. Гранулемы создают необходимое микроокружение, которое способствует изменению иммунологической толерантности и постоянной выработки антител, а заодно и Т-клеточно обусловленное воспаление. [96]

Проведенное обследование подтвердило, что у больных ГПА отмечается изменение соотношения Th1-Th2 с подавлением Th2 иммунного ответа (наличие обратной корреляционной зависимости с экспрессией мРНК ИЛ-4), преобладание Th1 типа иммунного ответа при формировании гранулематозного воспаления (наличие прямой корреляционной зависимости с экспрессией мРНК ИЛ-18, который является мощным индуктором ИФН- γ). Наличие обратной корреляционной зависимости с ИЛ-10 говорит о том, что создаются условия для подавления противовоспалительного эффекта ИЛ-10, а следовательно развития гранулематозного воспаления у больных ГПА.

Поражение органов и тканей

Поражение носа у больных ГПА характеризуется язвенно-некротическим ринитом, который может приводить к перфорации носовой перегородки вследствие разрушения носового хряща. Гистологическое исследование биопсии носа выявляет наличие васкулита мелких сосудов, гранулемы и экстравазальный некроз. [5].

В результате проведенного исследования выявлено, что у больных ГПА, имеющих поражение носа и придаточных пазух отмечается достоверная обратная корреляционная зависимость с наличием экспрессии мРНК ИЛ-4 (-0,86) и ИЛ-12 (-0,86) в МПК, уровнем сывороточного ИФН- α (-0,68). ИЛ-4 обеспечивает развитие Th2 типа иммунного ответа и выработку

антител, обеспечивающих развитие васкулита.[18] ИЛ-12 является своеобразным антагонистом ИЛ-4, так как обеспечивает развитие Th1 типа иммунного ответа [28], участвующего в формировании гранулемы.[39] Обнаружение достоверной обратной корреляционной зависимости между экспрессией ИЛ-4, ИЛ-12 в МПК и поражением носа и придаточных пазух дает основание предполагать, что МПК не участвуют в развитии Th1 и Th2 типов иммунного при поражении носа и придаточных пазух у больных ГПА. Таким образом, при поражении носа и придаточных пазух у больных ГПА оправданно изучение экспрессии цитокинов в тканевом микроокружении, то есть локально. ИФН- α , циркулирующий в системном кровотоке, является фактором неспецифической противовирусной защиты, индуктором выработки ИФН- γ . [86] Однако, при поражении носа и придаточных пазух носа у больных ГПА отмечается достоверная обратная корреляционная зависимость с продукцией ИФН- α , что говорит об изменении противовирусной защиты у больных ГПА.

Поражение орбиты – наиболее частое офтальмологическое проявление при различных клинических формах гранулематоза с полиангиитом. Поражение глазницы характеризуется развитием гранулем, дакриoadенита с выраженной воспалительной инфильтрацией окружающих тканей, в том числе глазодвигательных мышц, деструкцией костных стенок глазницы. Нередко встречаются неспецифические конъюнктивиты, эписклериты, наблюдается вторичное повреждение зрительного нерва вследствие васкулитов сосудов сетчатки в 10-18% случаев больных с вовлечением органа зрения.[97]

Исследование демонстрирует, что мононуклеары периферической крови больных ГПА с поражением органа зрения экспрессируют цитокины, которые способствуют развитию как васкулита (ИЛ-4 стимулирует синтез АТ В-лимфоцитами) [29], так и гранулематозного воспаления (ИЛ-12 стимулирует рост и дифференцировку Th0 в Th1)[18]. ИЛ-18,

циркулирующий в системном кровотоке способен поддерживать как Th1, так и Th2 тип иммунного ответа (с преобладанием Th1 типа иммунного ответа). ИЛ-18 участвует в макрофагальном иммунитете[34]. Прейотропность действия ИЛ-18 способствует развитию как васкулита, так и гранулематозного воспаления у больных ГПА с поражением зрения.

Поражение органа слуха встречается приблизительно у 40% больных. У большинства пациентов с ГПА с поражением органа слуха диагностируется экссудативный средний отит, который развивается вследствие непосредственного поражения среднего уха и полости сосцевидного отростка некротизирующей гранулемой, которая сочетается с экссудативным процессом, мастоидитом и параличом лицевого нерва.[98] Выявление достоверной обратной корреляционной зависимости между экспрессией ИЛ-12 в МПК и поражением органа слуха позволяет предположить, что мононуклеары периферической крови не способствуют развитию Th1-типа иммунного при поражении органа слуха у больных ГПА. Наличие обратной корреляционной зависимости с продукцией ИЛ-18, который является мощным индуктором ИФН- γ в системном кровотоке дает основание заподозрить наличие нарушения механизмов развития клеточного иммунитета при поражении органа слуха у больных ГПА.

Поражение гортани и/или трахеи, такое как изъязвление или подглоточный стеноз встречаются не часто, но в некоторых случаях может быть единственным проявлением ГПА. Подглоточный стеноз встречается у 10-20% больных ГПА и наиболее часто в детском и подростковом возрасте. Основная причина подглоточного стеноза – это деструкция окружающей ткани, вызванная васкулитом и уменьшением кровоснабжения зоны поражения. Гистологическое исследование пораженной зоны трахеи и гортани у больных ГПА выявило наличие грануляционной ткани и васкулита. [99] Учитывая наличие достоверной обратной сильной корреляционной зависимости между экспрессии мРНК ИФН- γ в МПК и

поражением гортани у больных ГПА, можно предположить, что в периферических мононуклеарах больных ГПА с поражением гортани нарушается Th1/Th2 баланс и угнетается Th1 тип иммунного ответа (клеточный иммунитет). Также угнетение Th1 типа иммунного ответа при поражении гортани у больных ГПА можно предположить из-за наличия обратной достоверной корреляционной зависимости с продукцией ИЛ-18 у больных ГПА. ИЛ-6 обладает про и противовоспалительными свойствами, способен активировать макрофаги.[31] Наличие обратной достоверной корреляционной зависимости между экспрессией гена ИЛ-6 в МПК и поражением гортани указывает на то, что периферические мононуклеары не участвуют в выработке ИЛ-6 при поражении гортани. Вероятно, при поражении гортани, целесообразно изучение локальной продукции цитокинов.

При изучении патоморфологии поражения легких у больных с васкулитами описаны основные гистологические особенности, характеризующие поражение легких у больных ГПА: наличие некроза, гранулематозного воспаления и васкулита. Гранулемы могут быть нескольких видов, включая наличие рассеянных или в виде «рыхлых гроздей» гигантских клеток, окруженных гистиоцитами, или гигантских клеток, выстилающих географический некроз или микроабсцессы, и окружающих микрогранулемы.[100] Обнаружение достоверной прямой корреляционной зависимости между поражением легких и экспрессией генов ИФН- γ , ИЛ-6 и ФНО- α в МПК у больных ГПА дает основание предполагать, что МПК являются активными участниками развития легочного поражения у данной группы больных. Экспрессия ИФН- γ обеспечивает развитие Th1 типа иммунного ответа и формирование гранулемы[32], ФНО- α обеспечивает презентацию протеиназы 3 на поверхности нейтрофила и как следствие развитие васкулита сосудов легких.[30] ИЛ-6 обладает свойствами как про-, так и противовоспалительного цитокина, который способен обеспечить развитие как острого, так и хронического воспаления[32] в легких у больных

ГПА. Наличие прямой достоверной корреляционной зависимости между продукцией ИЛ-18 и поражением легких у больных ГПА, указывает, что данный цитокин является участником развития поражения легких у данной группы больных, способствуя формированию гранулемы (Th1 иммунный ответ), васкулита (Th2 иммунный ответ), а также активации макрофагального звена иммунитета.

Поражение почек представляет собой некротизирующий процесс мелких и средних артерий с быстроразвивающимся фибриноидным некрозом деструкцией и массивными полиморфно-клеточными инфильтратами. Слабоиммунный некротизирующий гломерулонефрит с полулуниями является морфологическим отличительным критерием АНЦА-ассоциированных васкулитов. Тяжесть и распространенность повреждения может значительно варьироваться: от некроза почечного клубочка до массивных (циркулярный, круговых, периферических) полулуний и частых перигломерулярных гранулематозных реакций. Диффузная или выраженная интерстициальная инфильтрация Т и В-лимфоцитами, моноцитами и макрофагами представляет собой другую частую морфологическую особенность тубулита.[5] В результате проведенного исследования выявлена достоверная обратная корреляционная зависимость между поражением почек у больных ГПА и уровнем экспрессии гена ИФН- α (-0,36), что может указывать на изменение функционирования ЦТЛ, НК-клеток и Т-клеток у больных ГПА с поражением почек. Данное предположение подтверждается работой Тоqnarelli и соавторов, где было показано, что помимо воспалительных процессов при ГПА, почечные микрососудистые эндотелиальные клетки могут способствовать накоплению и активации НК-клеток в стенках сосудов почек, которое может привести к формированию некротизирующего васкулита в почках при ГПА.[101]

Анализ корреляционных взаимосвязей определило наличие достоверной прямой корреляционной зависимости между экспрессией мРНК

ФНО- α в МПК; сывороточными ИЛ-8 (0,37) и ИЛ-18 (0,41) и снижением скорости клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1,73м² у больных ГПА с поражением почек. Кроме того, достоверная обратная корреляционная зависимость была обнаружена между наличием нарушения почечной функции со снижением скорости клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1,73м² у больных ГПА и уровнем сывороточного ИФН- α (-1,0). Снижение СКФ до уровня менее 60 мл/мин/1,73 м² свидетельствует о наличии продвинутой стадии ХБП. [103] ФНО- α обеспечивает презентацию протеиназы 3 на поверхности нейтрофила [30] и как следствие может способствовать развитию васкулита сосудов почек. ИЛ-8 способен повышать адгезивность нейтрофилов, вызвать повышение экспрессии молекулы адгезии-1, а также стимулирует транслокацию протеиназы 3 на поверхность нейтрофилов, тем самым обеспечивая большую вероятность связывания протеиназы 3 с АНЦА.[80] Таким образом, ФНО- α в МПК, уровень сывороточного ИЛ-8 у больных ГПА могут способствовать презентации протеиназы 3 на поверхности нейтрофилов и последующему повреждению сосудов почки. Наличие прямой достоверной корреляционной зависимости между уровнем сывороточного ИЛ-18 и снижением скорости клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1,73м² у обследованных больных ГПА с поражением почек (из 19 больных ГПА со снижением СКФ менее 60 мл/мин/1,73м² 11 имели обострение ГПА, 8 - ремиссию ГПА), указывает, что данный цитокин участвует в патогенезе васкулита в почке и, как следствия, нарушения функции почек. Повышение его уровня в сыворотке крови у больных ГПА в нашем исследовании коррелировало со степенью снижения почечной функции у данной группы больных, способствуя формированию Th1 и Th2 типа иммунного ответа, а также активации макрофагального звена иммунитета.

Лечение больных ГПА и ограничения нашего исследования:

Все пациенты, включенные в исследование получали соответствующую терапию согласно Российским и международным рекомендациям по лечению ГПА. Отмена лечения была невозможна по этическим причинам, а также в связи с тем, что гранулематоз с полиангиитом является одним из самых тяжелых и прогностически неблагоприятных системных васкулитов [5] и отказ от терапии спровоцировал бы обострение заболевания, а при наличии генерализованного ГПА привел бы к гибели более 80% больных в течение одного года. [10]

Оценка цитокинового профиля у больных с впервые выявленным ГПА, до назначения необходимой терапии, представляется крайне сложной задачей в связи низкой заболеваемостью ГПА (варьируется от 2 до 12 случаев на 1 миллион жителей в год). [8] Кроме того, всем пациентам с ГПА, поступившим впервые в клинику, на догоспитальном этапе в связи с тяжестью заболевания проводилась терапия, в том числе ГКС.

В работе Lamprecht и соавторов указывается, что стандартная схема лечения больных ГПА циклофосфамидом в сочетании с ГКС проявляют свои эффекты *in vitro* путем нормализации цитокинового ответа Th1 типа, а ЦФА может поддерживать данную модель развития цитокинового ответа. [66] В работе Zhu и соавторов показано, что ЦФА воздействует, в основном на гуморальный иммунитет, значительно подавляя функцию В-клеток и уменьшая продукцию антител. [104] Однако, масштабных исследований изменения цитокинов у больных ГПА (*in vivo*) до и после индукционной терапии не проводилось. Тяжесть заболевания и высокая вероятность фульминантного течения болезни определяют необходимость незамедлительного начала терапии.

Следует отметить, что исследование цитокинов у обследованной группы больных ГПА, оценка активности и формы заболевания проводилось до изменения (в том числе усиления) проводимой терапии.

Определение цитокинов в динамике у больных ГПА, например, до и после индукционной терапии представляет особый интерес и требует углубления знаний в этой области.

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 сокращений

ГПА	Гранулематоз с полиангиитом
ACR	Американская коллегия ревматологов
ANCA, АНЦА	Антитела к цитоплазме нейтрофилов
BVAS	Бирмингемский индекс активности васкулита
VDI	Индекс повреждений при васкулите
PR3	Протеиназа 3
ППН	Придаточные пазухи носа
IgA	Иммуноглобулин А
IgE	Иммуноглобулин Е
IgG	Иммуноглобулин G
WGET	Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
ИЛ-1 β	Интерлейкин 1 бета
ИЛ-2	Интерлейкин 2
ИЛ-4	Интерлейкин 4
ИЛ-5	Интерлейкин 5
ИЛ-6	Интерлейкин 6
ИЛ-8	Интерлейкин 8
ИЛ-10	Интерлейкин 10
ИЛ-12	Интерлейкин 12

ИЛ-18	Интерлейкин 18
ИФН- α	Интерферон- α
ИФН- β	Интерферон- β
ИФН- γ	Интерферон- γ
ФНО- α	Фактор некроза опухоли альфа
МПК	Мононуклеары периферической крови
ИФА	иммуноферментный анализ
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
Th1	T-хелперы 1 типа
Th2	T-хелперы 2 типа
ЦТЛ	Цитотоксические лимфоциты
ЕК	Естественные киллеры
ГКС	Глюкокортикостероид
ЦФА	Циклофосфамид
МТТ	Метотрексат
АЗА	Азатиоприн
ММФ	Микофенолат мофетил
MDRD	Модификация диеты при заболеваниях почек
СОЭ	Скорость оседания эритроцитов
СРБ	С-реактивный белок

Об/мин	Оборотов в минуту
ROC	Receiver operating characteristic, рабочая характеристика приёмника
сАНЦА	Цитоплазматические антинейтрофильные цитоплазматические антитела
рАНЦА	Перинуклеарные антинейтрофильные цитоплазматические антитела
ПЗ	Преднизолон

Список литературы:

1. Семенкова Е.Н. Диагностика и клинические варианты гранулематоза Вегенера // Ревматология. – 1984. – № 3. – с. 24-28.
2. Семенкова Е.Н. Поражение легких при узелковом периартериите и гранулематозе Вегенера // Терапевтический архив. – 1979. – № 10. – с. 46-49.
3. Клименко С.В., Семенкова Е.Н., Кривошеев О.Г. Применение человеческого иммуноглобулина в комплексном лечении гранулематоза Вегенера // Лечащий врач. – 2005. – № 4. – с. 50-52.
4. Новиков П.И., Семенкова Е.Н., Моисеев С.В. Современная номенклатура системных васкулитов // Клиническая фармакология и терапия. - 2013. -22 (1). - стр. 70-74.
5. Семенкова Е.Н. Системные некротизирующие васкулиты. - М.-Издательский дом «Русский врач». - 2001. - 48 с.
6. Клименко С.В., Кривошеев О.Г. Клинические особенности современного гранулематоза Вегенера: варианты течения, прогноз // Врач. – 2005. – № 12. – с. 39-41.
7. Buraa Kubaisi, Khawla Abu Samra, C. Stephen Foster. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's disease): An updated review of ocular disease manifestations // Intractable Rare Dis Res. – 2016. - 5(2). – p. 61–69.
8. Mohammad A.J., Jacobsson L.T., Westman K.W. et al. Incidence and survival rates in Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome and polyarteritis nodosa // Rheumatology (Oxford, England).- 2009.- 48.- p. 1560–1565.
9. Новиков П.И., Моисеев С.В., Семенкова Е.Н. [и др]. Тяжелые нежелательные эффекты при лечении биологическими препаратами у

больных ревматическими заболеваниями // Клиническая фармакология и терапия.- 2012.- Т.21.- №5.- стр. 86-90.

10. Новиков П. И.. Клиническая оценка вариантов течения и прогноза Гранулематоза с полиангиитом (Вегенера): Дис. ... канд. мед. наук.- Москва, 2015.- 113 с.

11. Симбирцев А.С.. Перспективы применения препаратов цитокинов в дерматовенерологии // Практическая медицина. Дерматология. Косметология.- 2011.- Т.2.- стр.10-15.

12. Бекетова Т.В. Перспективы применения ритуксимаба при васкулитах, ассоциированных с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами. Обзор литературы // Научно-практическая ревматология. – 2010. – № 4. – с. 80-89.

13. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Баранов А.А. [и др]. Иммунологические методы оценки активности некротизирующих васкулитов (гранулематоза Вегенера и микроскопического полиартериита) с поражением почек // Терапевтический архив. – 1996. – № 6. – с. 50-52.

14. Müller A., Trabandt A., Gloeckner-Hofmann K. et al. Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN-gamma expression // J. Pathol.- 2000.-192(1).- p.113-120.

15. Stone J.H. Limited versus severe Wegener's granulomatosis: baseline data on patients in the Wegener's granulomatosis etanercept trial // Arthritis Rheum.- 2003.- 48.- p. 2299–2309.

16. Долгих С.В., Мазуров В.И. Клинико-иммунологическая характеристика системных васкулитов // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т.10 (2). – с.224.

17. Balding C.E., Howie A.J., Drake-Lee A.B. et al. Th2 dominance in nasal mucosa in patients with Wegener's granulomatosis. // Clin. Exp. Immunol. – 2001.- 125(2).- p.332-339.
18. Lúdvíksson B.R., Sneller M.C., Chua K.S. et al. Active Wegener's Granulomatosis Is Associated with HLA-DR⁺CD4⁺T Cells Exhibiting an Unbalanced Th1-Type T Cell Cytokine Pattern: Reversal with IL-10 // J. Immunol.-1998.- 160(7).- p.3602-3609.
19. Abdulahad W.H., Stegeman C.A, Limburg P.C. et al. Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission. // Arthritis Rheum.-2008.-58(7).- p. 2196-2205.
20. Долгих С.В. Клинико-иммунологические взаимосвязи при системных васкулитах, ассоциированных с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами: Дис. ... канд. мед. наук.- СПб.- 2009.- 119 с.
21. Кривошеев О.Г., Новиков П.И., Бородин О.О. Гранулематоз Вегенера // Медицинский вестник.- 2009. — № 25. стр. 25-34
22. Leavitt R.Y., Fauci A.S., Bloch D.A. et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis.// Arthritis Rheum.- 1990.-33.- p.1101-1107.
23. Бекетова ТВ, Насонов ЕЛ. Современные представления о классификации и лечении системных васкулитов, ассоциированных с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами: итоги 2011 г. // Терапевтический архив.- 2012.-5.- стр. 68-74.
24. Моисеев С.В., Новиков П.И., Мешков А.Д., Иваницкий Л.В. АНЦА-ассоциированные васкулиты: спорные вопросы классификации, диагностики и оценки активности и современные подходы к лечению. // Клиническая фармакология и терапия. – 2014. – № 1. – с. 44-50.

25. Hoffman G.S., Kerr G.S., Leavitt R.Y. et al. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. // Ann. Intern. Med.- 1992.-116.- p. 488–498.
26. Jayne D. Update on the European Vasculitis Study Group (EUVAS). //Curr. Opin. Rheumatol.- 2001.- №13.- p. 48–55.
27. Новиков П.И., Семенкова Е.Н., Кривошеев О.Г. Опыт использования моноклональных антител к рецепторам CD20 В-лимфоцитов (ритуксимаба) у больных с поражением почек при гранулематозе Вегенера. // Терапевтический архив. – 2011. – № 11. – с. 70-76.
28. Воробьев А.А., Быков А.С., Караулов А.В. Иммунология и аллергология. Цветной атлас / Под редакцией А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова.- М.:- Практическая медицина. – 2006.- 51 с.
29. Захарова Е.В. ANCA-ассоциированные и криоглобулинемические васкулиты: диагностика и лечение. / М.: Нефрология и диализ.- 2005.-Т7.- №1.- стр.6-21.
30. Nattar K., Bickenbach A., Csernok E. et al. Wegener's granulomatosis: antiproteinase 3 antibodies induce monocyte cytokine and prostanoid release-role of autocrine cell activation. // J. Leukoc. Biol.- 2002.-71(6).- p. 996-1004.
31. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. / СПб: ООО «Издательство Фолиант».- 2008.-552 с.
32. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление.-2004.-Т.3.-№2.-стр.16-23
33. Хаитов Р.М. Иммунология: учебник для студентов медицинских вузов. / М.: ГЭОТАР-Медия,- 2006. – 320 с.

34. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Интерлейкин 18 и его роль в иммунном ответе. // Медицинская иммунология.- 2005.- Т.7(4).-стр. 355-364.
35. Мухин Н.А., Новиков П.И., Моисеев С.В. [и др.] Эффективность и безопасность генно-инженерных биологических препаратов у пациентов с ревматоидным артритом и другими ревматическими заболеваниями (проспективное неконтролируемое исследование). // Клиническая фармакология и терапия.- 2012.- Т21.- №5.- стр. 25-32.
36. Долгих С.В. Иммунологическая характеристика ANCA-ассоциированных системных васкулитов / С.В. Долгих, В.И. Мазуров // Омский научный вестник. Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири». – 2007. - №3(61). – Прил. – стр. 194-195.
37. Reinhold-Keller E., Lamprecht P, Feller A.C. et al. Polyarthritis following interferon alpha treatment in a patient with localized Wegener's granulomatosis. // Clin. Exp. Rheumatol.- 2001.-№19.- p. 227–228.
38. Csernok E.,Trabandt A., Müller A., Wang G.C. et al. Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis: Predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation. // Arthritis Rheum. - 1999.- 42(4).- p. 742-750.
39. Tomer Y., Barak V., Gilburd B. et al. Cytokines in experimental autoimmune vasculitis: evidence for a Th2 type response. // Clin. Exp. Rheumatol.- 1999.- 17(5).- p. 521-526.
40. Tomasson G., Lavalley M., Tanriverdi K. et al. Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial (WGET) Research Group. Relationship between markers of platelet activation and inflammation with disease activity in Wegener's granulomatosis. // J. Rheumatol. -2011.-38(6).- p.1048-1054.

41. Richter A.G., Perkins G.D., Chavda A. Neutrophil chemotaxis in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) and idiopathic pulmonary fibrosis. // Eur. Respir. J.-2011.-38(5).- p.1081-1088.
42. Rani L., Minz R.W., Sharma A. et al. Predominance of PR3 specific immune response and skewed TH17 vs. T-regulatory milieu in active granulomatosis with polyangiitis. // Cytokine.-2015.-71(2).-p. 261-267.
43. Novick D., Elbirt D., Dinarello C.A. Interleukin-18 binding protein in the sera of patients with Wegener's granulomatosis. // J. Clin. Immunol.- 2009.- 29(1).- p. 38-45.
44. Инструкция по применению набора для реагентов ЗАО "Вектор-Бест"/ Вектор-Бест.- Новосибирск.- 2012.- стр.9
45. Dejica D. Serum soluble IL-2 receptor as a marker of lymphocyte activation in some autoimmune diseases. Effect of immunosuppressive therapy. // Roum. Arch. Microbiol. Immunol.-2001.-60 (3).- p. 183-201.
46. Park J., Lee E.B., Song Y.W. Decreased tumour necrosis factor- α production by monocytes of granulomatosis with polyangiitis. // Scand. J. Rheumatol.-2014.- 43(5).- p.403-408.
47. Hattar K., Oppermann S., Ankele C. C-ANCA-induced neutrophil-mediated lung injury: a model of acute Wegener's granulomatosis. // Eur. Respir. J.- 2010.- 36(1).- p.187-195.
48. Holmén C., Elsheikh E., Stenvinkel P. Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement. // J. Am. Soc. Nephrol.-2005.-16(10).- p. 3110-3120.

49. Uehara A., Sato T., Iwashiro A. et al. PR3-ANCA in Wegener's granulomatosis prime human mononuclear cells for enhanced activation via TLRs and NOD1/2 // *Diagn.Pathol.* - 2009.- 14 (4).- p. 23.
50. Schnabel A., Csernok E., Braun J., et al. Activation of neutrophils, eosinophils, and lymphocytes in the lower respiratory tract in Wegener's granulomatosis // *Am J Respir Crit Care Med.*- 2000.-161.- p. 399–405.
51. Hoffman G.S., Sechler J.M., Gallin J.I. et al. Bronchoalveolar lavage analysis in Wegener's granulomatosis. A method to study disease pathogenesis // *Am Rev Respir Dis.*- 1991.- 143.- p. 401–407.
52. Wagner J.G., Roth R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature // *Pharmacol Rev.*- 2000.- 52.- p. 349–374.
53. Strieter R.M., Gomperts B.N., Keane M.P. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis // *J Clin Invest.*- 2007.- 117.- p. 549–556.
54. Perkins G.D., Nathani N., McAuley D.F., et al. In vitro and in vivo effects of salbutamol on neutrophil function in acute lung injury // *Thorax.*- 2007.- 62.- p. 36–42.
55. Torheim E.A., Yndestad A., Bjerkeli V. et al. Increased expression of chemokines in patients with Wegener's granulomatosis – modulating effects of methylprednisolone in vitro // *Clin Exp Immunol.*-2005.- 140-p. 376–383.
56. Ohta N., Fukase S., Aoyagi M. Serum levels of soluble adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in patients with Wegener's granulomatosis // *Auris Nasus Larynx.*- 2001.- 28.- p. 311–314.
57. Cockwell P., Brooks C.J., Adu D., et al. Interleukin-8: a pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis // *Kidney Int.*- 1999.-55.-p. 852–863.

58. Schnabel A., Csernok E., Braun J. et al. Inflammatory cells and cellular activation in the lower respiratory tract in Churg-Strauss syndrome. // *Thorax*.-1999.- 54.- p. 771–778.
59. Jonker N.D., Peters A.M., Gaskin G. et al. A retrospective study of radiolabeled granulocyte kinetics in patients with systemic vasculitis // *J Nucl Med*.-1992.- 33.- p. 491–497.
60. Ralston D.R., Marsh C.B., Lowe M.P. et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, α_1 -antitrypsin, and Fc γ receptors // *J Clin Invest*.-1997.- 100.- p. 1416–1424.
61. Csernok E., Ernst M., Schmitt W. et al. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo // *Clin Exp Immunol*.-1994.- 95.- p. 244–250.
62. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // *Blood*.-1997.- 89.- p. 3503–3521.
63. Schmekel B, Karlsson SE, Linden M, et al. Myeloperoxidase in human lung lavage. I. A marker of local neutrophil activity // *Inflammation*.-1990.- 14.- p. 447–454.
64. Kettritz R, Jennette JC, Falk RJ. Crosslinking of ANCA-antigens stimulates superoxide release by human neutrophils // *J Am Soc Nephrol*.-1997.- 8.-p.386–394.
65. Hoffman GS. Treatment of Wegener's granulomatosis: time to change the standard of care? // *Arthritis Rheum*.-1997.-40.- p. 2099–2104.
66. Lamprecht P., Kumanovics G., Mueller A., Csernok E., Komocsi A., Trabandt A., Gross W. L., and Schnabel A. Elevated monocytic IL-12 and TNF- α

production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and corticosteroid therapy // *Clin Exp Immunol.*- 2002.- 128(1).- p. 181–186.

67. Stone J.H, Uhlfelder M.L, Hellmann D.B et al. Etanercept combined with conventional treatment in Wegener's granulomatosis: a six-month open-label trial to evaluate safety // *Arthritis Rheum.*- 2001.-44.- p. 1149-1154.

68. Bartolucci P, Ramanoelina J, Cohen P, et al. Efficacy of the anti-TNF-alpha antibody infliximab against refractory systemic vasculitides: an open pilot study on 10 patients // *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1126-1132

69.Lamprecht P., Voswinkel J., Lilienthal T. et al. Effectiveness of TNF-alpha blockade with infliximab in refractory Wegener's granulomatosis. // *Rheumatology (Oxford).*- 2002.-41.-p. 1303-1307

70. Booth A.D., Bacon P.A., Griffith M.E., et al. Infliximab in ANCA-associated vasculitis: the “ACTIVE“ trial.// *Kidney Blood Press Res.*-2003.-26.- p. 292-293

71. Henderson C.F., Seo P. Biologic agents in systemic vasculitis.// *Int J Clin Rheumtol.*-2011.-6(4).- p. 453-462.

72. Jung J.H., Song G.G., Lee Y.H. Meta-Analysis of Associations Between Interleukin-10 Polymorphisms and Susceptibility to Vasculitis. // *Immunol Invest.*-2015.- 44(6).- p. 553-565.

73. Suppiah R., Mukhtyar C., Flossmann O. et al. A cross-sectional study of the Birmingham Vasculitis Activity Score version 3 in systemic vasculitis // *Rheumatology (Oxford).*-2011.-50(5).-p. 899-905.

74. Exley A.R., Bacon P.A., Luqmani R.A. et. al. Development and initial validation of the VDI. // *Arthritis Rheum.*-1997.- 40.- p.371–380.

75. Watts R., Lane S., Hanslik T., al. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and

polyarteritis nodosa for epidemiological studies // Ann Rheum Dis 2007.-66(2).-p. 222-227.

76. Mueller A., Holl-Ulrich K., Gross W.L.. Granuloma in ANCA-associated vasculitides: another reason to distinguish between syndromes? // Curr Rheumatol Rep.- 2013.- 15(11) p. 376.

77. Новиков П.И., Моисеев С.В., Кузнецова Е.И. [и др.] Изменения течения заболевания и прогноза гранулематоза с полиангиитом (Вегенера): результаты 40- летнего наблюдения. // Клиническая фармакология и терапия. – 2014. – № 1. – с. 32-37.

78. Watts R., Lane S., Hanslik T. et al. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies //Ann Rheum Dis.- 2007.-66(2).- p.222-227.

79. Mueller A, Holl-Ulrich K, Gross WL. Granuloma in ANCA-associated vasculitides: another reason to distinguish between syndromes? // Curr Rheumatol Rep.-2013.-15(11).- p. 376

80. Бекетова Т.В. Гранулематоз с полиангиитом, патогенетически связанный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами: особенности клинического течения. // Научно-практическая ревматология.- 2012.- 50 (6).- стр. 19-28.

81. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.// Analytical Biochemistry. – 1987. – V. 162. – P. 156-159.

82. Gelder C., Thomas P., Yates D. Cytokine expression in normal, atopic, and asthmatic subjects using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction.// Thorax. – 1995. – V. 50. – P. 1033-1037.

83. Ершов Ф.И., Мезенцева М.В., Васильев А.Н. [и др.] Методические указания по проведению доклинических исследований цитокин-индуцирующей активности противовирусных препаратов // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств.- 2002.- № 1 (9).- стр. 26-29.
84. С.В. Сенников, А.Н. Силков. Методы определения цитокинов // Цитокины и воспаление.- 2005.- Т. 4(1).- стр. 22–27.
85. Hoshino T., Wiltrout R.H., Young H.A. IL 18 is a potent coinducer of IL 13 in NK and T cells: a new potential role for IL 18 in modulating the immune response // J. Immunol.-1999.-Vol.162.- P. 5070-5077.
86. Ф.И. Ершов, О.И. Киселев Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). / М.: «ГЭОТАР-Медиа».-2005.- стр. 42.
87. Lukacs N.W., Chensue S.W., Strieter R.M. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1 // J Immunol 1994.-152.- p. 5883–5889.
88. Borgmann S., Endisch G., Hacker U.T. et. al. Proinflammatory genotype of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist is associated with ESRD in proteinase 3-ANCA vasculitis patients //Am J Kidney Dis.- 2003.- 41(5) p. 933-942.
89. Merendino R.A., Di Pasquale G, Sturniolo G.C., Ruello A., Albanese V., Minciullo P.L., Di Mauro S., Gangemi S. Relationship between IL 18 and sICAM 1 serum levels in patients affected by coeliac disease: preliminary considerations // Immunol. Lett. 2003. Vol. 85. P. 257–60.
90. Morel J.C., Park C.C., Zhu K. Signal transduction pathways involved in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin 18 induced vascular cell

adhesion molecule 1 expression // J. Biol. Chem.-2002.-Vol. 277.- P. 34679-691.

91. Ю.И.Рагино, А.М.Чернявский, Я.В. Полонская и др. Изменение содержания провоспалительных цитокинов и деструктивных металлопротеиназ в процессе развития атеросклеротического очага до нестабильностей бляшки.// Кардиология. - 2009. - № 6. - С. 43 - 48.

92. Гучетль Е.В., Колесникова Н.В., Дорошенкова А.Е. Уровни содержания IL-1a и IL-1b у пациентов с внелегочным туберкулезом разной степени активности // Кубанский научный медицинский вестник.- 2005.- №5.- с.77-79.

93. D. C. Crossman, Allison C. Morton, Julian P. et al. Investigation of the effect of Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes (The MRC-ILA-HEART Study) // Trials. - 2008. - №9. - С. 1-14.

94. Dinarello, C.A. Proinflammatory cytokines in heart disease/ C.A. Dinarello, B.J. Pomerantz // Blood Purif. - 2001. - № 19(3). – 314 - 321.

95. Романцов М.Г., Ершов Ф.И. Часто болеющие дети. // Современная фармакотерапия: Руководство для врачей. – Изд. 2е, испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа.- 2009.- с. 302.

96. Lamprecht P., Wiczorek S., Epplen J.T. Granuloma formation in ANCA-associated vasculitides. APMIS.- 117 (Suppl. 127): 32–36

97. Т.Г. Рябичева, Н.А. Вараксин, Н.В. Тимофеева. Сравнение наборов реагентов для определения интерлейкина-1 β и интерлейкина 6 двух различных производителей // Цитокины и воспаление.- 2007.- № 2.- стр. 71

98. Witko-Sarsat V., Daniel S., Noël L., Mouthon L. Neutrophils and B lymphocytes in ANCA associated vasculitis. // APMIS.-2009.-117.- p. 27–33

99. Klapa S., Mueller A., Csernok E. et al. Lower numbers of FoxP3 and CCR4 co-expressing cells in an elevated subpopulation of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells from Wegener's granulomatosis // Clin Exp Rheumatol.-2010.-28 (1 Suppl 57).- p. 72-80.
100. Груша Я.О., Исмаилова Д.С., Новиков П.И., Абрамова Ю.В. Офтальмологические проявления гранулематоза с полиангиитом (гранулематоз Вегенера) //Терапевтический архив.- 2015.- 87(12).-стр. 111-116.
101. Maniu AA, Harabagiu O, Damian L.O. et. at. Mastoiditis and facial paralysis as initial manifestations of temporal bone systemic diseases - the significance of the histopathological examination. // Rom. J. Morphol. Embryol.- 2016.- 57(1).- p. 243-248.
102. Lee P.Y., Adil E.A., Irace A.L. The presentation and management of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's Granulomatosis) in the pediatric airway // Laryngoscope.- 2017.-127(1).- p. 233-240.
103. Travis W.D. Pathology of pulmonary vasculitis. // Semin. Respir. Crit. Care Med.- 2004.- 25(5).-p. 475-82.
104. Tognarelli S, Gayet J, Lambert M, et. al. Tissue-specific microvascular endothelial cells show distinct capacity to activate NK cells: implications for the pathophysiology of granulomatosis with polyangiitis. // J. Immunol.-2014.- 192(7).- p. 3399-3408
105. Шилов Е. М. Хроническая болезнь почек и нефропротективная терапия./ Методическое руководство для врачей.- М.- 2012.- 83 с.
106. Zhu LP, Cupps TR, Whalen G, Fauci AS. Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation and differentiation of human B cells.// J Clin Invest.-1987.-79.- p. 1082–90.