

*На правах рукописи*



**Радыгина Татьяна Вячеславовна**

**Прогностические критерии эффективности терапии  
генно-инженерными препаратами при иммунозависимых заболеваниях в  
детском возрасте**

3.2.7. Иммунология

3.1.21. Педиатрия

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
доктора медицинских наук

Москва – 2026 год

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России)

**Научные консультанты:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Петричук Светлана Валентиновна**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Фисенко Андрей Петрович**

**Официальные оппоненты:**

**Ненашева Наталья Михайловна** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой аллергологии и иммунологии

**Курбачева Оксана Михайловна** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, заведующая отделением бронхиальной астмы

**Смолкин Юрий Соломонович** – доктор медицинских наук, доцент, Академия постдипломного образования «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» октября 2026 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.173.01 при ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова по адресу: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова и на сайте <https://instmech.ru/ru/>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
Кандидат медицинских наук

Мурзина Алёна Андреевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Всё большую социально-экономическую значимость приобретают вопросы диагностики и лечения иммунозависимых заболеваний (ИЗЗ) разного генеза. Наблюдается тенденция к росту общей заболеваемости ИЗЗ и частоты их тяжелых форм. Считается доказанным, что каждый 10-ый взрослый человек болен каким-либо аутоиммунным заболеванием [Congrad C. et al., 2023]. Согласно опубликованным данным, распространённость основных форм воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) в Российской Федерации составляет для язвенного колита (ЯК) порядка 4-х случаев на 100 тысяч населения, для болезни Крона (БК) – около 0,8 случаев на 100 тысяч. Примечательно, что до 20-25% случаев в структуре заболеваемости ВЗК приходится на детскую популяцию [Князев О.В. и соавт., 2020]. Распространенность рассеянного склероза (РС) изменяется от 36 до 79 случаев на 100 тыс. населения в зависимости от региона, а доля педиатрических пациентов в структуре заболеваемости составляет от 3 до 10% [Walton C. et al., 2020; Бойнова И.В. и соавт., 2022]. Распространенность псориаза (ПС) среди детей от 0 до 14 лет достигает 77 случаев на 100 тыс. педиатрической популяции [Кунгуров Н.В. и соавт., 2021].

Лечение детей с ВЗК, ПС и РС проводится согласно клиническим рекомендациям и начинается с базовой терапии. Переход на терапию генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП) у детей с ВЗК и ПС показан для среднетяжелой или тяжелой формы течения заболеваний при отсутствии ответа на предшествующую (стандартную) терапию, при развитии нежелательных реакций и/или наличии противопоказаний [Van Rheenen, P. F. et al., 2021, Мурашкин Н.Н. и соавт., 2024]. У пациентов с РС назначаются биологические препараты, изменяющие течение заболевания, в том числе, интерферон  $\beta$ -1a [Абдуллаева Л.М. и соавт., 2023].

Действие ГИБП направлено на ингибирование пролиферации и миграции эффекторных Т-клеток, цитокинов, включая интерлейкины (IL-17, IL-12/23), фактор некроза опухоли альфа (TNF), интегрины ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7) и др. [Левитская А.В. и соавт., 2025]. Установлено, что часть пациентов (до 40%) не отвечает на терапию ГИБП, а у части пациентов (до 50%) развивается потеря эффекта и необходима коррекция лечения или смена препарата [Liau M.M. et al., 2019; Белоусова Е.А. и соавт., 2021; Kim, H. O. et al., 2021; Marsal J. et al., 2022]. ГИБП относятся к дорогостоящим препаратам, ежегодные затраты государства только на лечение ВЗК с применением ГИБП составляют 72,52 млрд. руб. [Веселов А. В. и соавт., 2020].

Рост заболеваемости иммунозависимыми патологиями в детской популяции, снижение эффективности стандартных схем терапии генно-инженерными биологическими препаратами обуславливают актуальность разработки прогностических критериев ответа на лечение, что имеет существенное клиническое значение.

## Степень разработанности темы

Показана роль субпопуляций Т-хелперов в патогенезе ИЗЗ, а также значимость их определения для оценки тяжести патологического процесса и эффективности применяемой терапии [Петричук С. В. и соавт., 2018; Ruocco G. et al. 2019; Yan J. et al., 2020; Vicic M. et al., 2021; Chen R. et al., 2024]. Одним из ключевых дефектов в патогенезе ИЗЗ является дисбаланс между Th17-лимфоцитами (Th17) и регуляторными Т-клетками (Treg) [Топтыгина А.П., 2017; Lee G. et al., 2018]. Описана роль клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSCs) в механизмах возникновения псориаза, ревматоидного артрита, болезни Крона, рассеянного склероза [Козлов В.А. и соавт., 2017; Xu D. et al., 2022]. Следствием снижения активности супрессорной функции регуляторных клеток (Treg и MDSCs) является утрата иммунологической толерантности с активацией аутоагрессивных клонов лимфоцитов и каскадом иммунных реакций [Заморина С. А. и соавт., 2019; Xu D. et al., 2022].

Продемонстрирована значимость клеток иммунной памяти в патогенезе различных иммунозависимых заболеваний [Raphael I. et al., 2020; Van Gisbergen K. et al., 2021;]. Выявлена взаимосвязь между увеличением циркулирующих субпопуляций Т-клеток памяти и активностью заболевания у детей с ВЗК [Pappa A. et al., 2023]. Использование биологической терапии может изменять популяционный состав Т-клеток памяти и снижать воспалительную активность, как это продемонстрировано у взрослых больных РС после применения интерферона  $\beta$ -1a [Bose T. et al., 2017].

Пуринергическая система регулирует различные процессы, включая иммунные реакции, функционирование Т-клеток, межклеточные взаимодействия, секрецию цитокинов и хемокинов, удаление внутриклеточных патогенов и генерирование активных форм кислорода [Головкин А.С. и соавт., 2018; Rai R. et al., 2022]. Внеклеточный аденозинтрифосфат (АТФ), высвобождающийся из разрушенных клеток, является сигналами опасности (damage-associated molecular pattern) и усиливает воспалительную реакцию. Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 относятся к ферментам пуринергической системы и катализируют реакции превращения АТФ до аденозина, который снижает интенсивность воспаления [Di Virgilio F., 2020]. Содержание субпопуляций лимфоцитов (Treg, Th17-лимфоцитов), экспрессирующих на своей поверхности CD39 и CD73, обладает высокой прогностической ценностью и может служить критерием эффективности лечения пациентов с ИЗЗ [Di Virgilio F. et al., 2020; Zeng J. et al., 2020].

Одним из современных направлений иммунологических исследований является изучение метаболического профиля иммунокомпетентных клеток в зависимости от этапа их дифференцировки и пролиферативной активности [Tomaszewicz M. et al., 2023]. Ключевым этапом активации наивных Т-лимфоцитов и их дифференцировки в эффекторные клетки под действием антигена является переключение клеточного метаболизма с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз (эффект Варбурга) [Kornberg M. D. et al., 2020; Будихина А. С. и соавт., 2021]. Перепрограммирование метаболических процессов обеспечивает энергетические и биосинтетические потребности интенсивно пролиферирующих клеток. Специализированные субпопуляции Т-лимфоцитов

характеризуются разными метаболическими профилями: для эффекторных клеток (Th1, Th2, Th17) типична активация гликолиза и глутаминолиза, в то время как регуляторные Т-лимфоциты поддерживают свою функцию преимущественно за счёт  $\beta$ -окисления жирных кислот и окислительного фосфорилирования [Antony I.R. et al., 2023].

Цитокины являются ключевыми медиаторами межклеточного взаимодействия, которые участвуют в поддержании гомеостаза, контролируют и регулируют иммунные и воспалительные реакции через сложные сети взаимодействий [Симбирцев А.С., 2018]. Баланс между эффекторными и регуляторными иммунными клетками, помимо метаболических процессов, регулируется цитокиновым микроокружением [Zhang S. et al., 2021]. Показана корреляция уровня циркулирующих цитокинов со стадиями заболевания при ИЗЗ [Bai Z. et al., 2019; Privitera G. et al., 2021; Brembilla N. C. et al., 2023].

Ядерный фактор транскрипции  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) представляет собой плейотропный регулятор экспрессии генов, который координирует ключевые клеточные процессы (дифференцировку, пролиферацию, апоптоз клеток, воспалительные реакции) [Rothschild D.E. et al., 2018; Sharfe N. et al., 2023]. Дисрегуляция сигнального пути NF- $\kappa\text{B}$  вносит существенный вклад в патогенез ВЗК, ПС, РС и др. [McDaniel D. et al., 2016; Zhang Q. et al., 2017; Abdallah H.V. et al., 2021; Sharfe N. et al., 2023,]. Мониторинг активности транскрипционного фактора  $\kappa\text{B}$  может использоваться для оценки интенсивности воспалительного процесса при ИЗЗ [Aksentijevich I. et al., 2017; Igrera N. et al., 2017; Liu T. et al., 2017].

Препаратами первой линии ГИБП являются блокаторы TNF у детей с ВЗК и псориазом средней и тяжелой степени тяжести [Белоусова Е.А. и соавт., 2021; Мурашкин Н.Н., 2024]. Внедрение терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) позволяет контролировать уровень анти-TNF препаратов в крови у больных ВЗК и повысить эффективность лечения [Ungaro R. et al., 2019]. У детей с ВЗК показано, что низкий уровень блокаторов TNF в сочетании с антителами к препарату ассоциирован с состоянием обострения [Turner D. et al., 2018]. На основании ТЛМ у пациентов с ВЗК можно изменить дозу и кратность введения препарата и, тем самым, уменьшить риск потери эффекта от терапии [Soenen R. et al., 2022].

Учитывая общие иммунные механизмы развития воспаления при болезни Крона, язвенном колите, псориазе и рассеянном склерозе в качестве потенциальных критериев ответа при лечении ГИБП можно рассматривать показатели субпопуляционного состава лимфоцитов (регуляторные и эффекторные клетки, Т-клетки памяти), концентрацию циркулирующих цитокинов, активность транскрипционных факторов, метаболическую активность лимфоцитов. Для оптимизации терапевтической стратегии и своевременной коррекции лечения ГИБП у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями необходима разработка алгоритма иммунологического обследования, позволяющего прогнозировать эффективность терапии.

## Цель и задачи исследования

Определить информативные прогностические критерии эффективности лечения генно-инженерными биологическими препаратами и разработать алгоритм иммунологического обследования детей с иммунозависимыми заболеваниями.

### Задачи исследования:

1. Установить изменения содержания Т-, В-лимфоцитов, НК-клеток и минорных популяций CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Treg, Th17, Thact) у детей с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом, ремиттирующим рассеянным склерозом на разных этапах лечения в зависимости от ответа на биологическую терапию.

2. Определить содержание и функциональную активность миелоидных клеток-супрессоров (MDSCs) у детей с иммунозависимыми формами патологии при разной активности воспалительного процесса и в зависимости от ответа на биологическую терапию.

3. Установить изменения содержания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти у детей с воспалительными заболеваниями кишечника, псориазом и рассеянным склерозом в зависимости от эффективности биологической терапии.

4. Определить изменения активности ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования в популяциях лимфоцитов при различной активности воспалительного процесса и эффективности биологической терапии иммунозависимых заболеваний у детей.

5. Определить изменения содержания регуляторных Т-клеток и Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз (CD39/CD73) в зависимости от длительности и эффективности биологической терапии иммунозависимых заболеваний у детей.

6. Установить изменения концентраций цитокинов и цитокиновых комплексов в сыворотке крови больных при различном течении (обострение/ремиссия) и в зависимости от эффективности биологической терапии иммунозависимых заболеваний у детей.

7. Установить информативность изменений содержания клеток с транслокацией ядерного фактора транскрипции κВ в популяциях лимфоцитов для определения активности воспалительного процесса при биологической терапии иммунозависимых заболеваний у детей.

8. Определить остаточные уровни блокаторов фактора некроза опухоли (TNF) и антилекарственных антител в крови у детей с воспалительными заболеваниями кишечника и псориазом для прогнозирования эффективности терапии генно-инженерными биологическими препаратами и оптимизации тактики лечения.

9. Определить выживаемость генно-инженерной биологической терапии в зависимости от клинических характеристик (возраста больных, длительности заболевания, активности течения болезни при инициации лечения), биологического препарата и изменений иммунологических показателей у детей с иммунозависимыми заболеваниями.

10. Разработать алгоритм оптимального иммунологического обследования детей с иммунозависимыми заболеваниями на основе прогностических критериев эффективности генно-инженерных биологических препаратов.

### Научная новизна

Впервые у детей с иммунопатологией (воспалительные заболевания кишечника, вульгарный псориаз, ремиттирующий рассеянный склероз) проведён сравнительный анализ динамики количественных показателей иммунных клеток: основных популяций лимфоцитов, минорных популяций CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Th17, регуляторных Т-клеток, активированных Т-хелперов), Т-клеток памяти, клеток-супрессоров миелоидного происхождения при разной эффективности лечения генно-инженерными биологическими препаратами (ингибиторами фактора некроза опухоли альфа и интерфероном бета-1а). Выявлены прогностические критерии (индекс Th17/Treg, относительное содержание клеток-супрессоров миелоидного происхождения, абсолютное содержание регуляторных клеток (MDSCs и Treg), относительное содержание популяций Т-клеток памяти) с расчетом пороговых значений для оценки вероятной эффективности лечения.

Впервые у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями независимо от формы патологии показана значимость определения метаболической активности клеток (по содержанию Treg и Th17-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидазы CD39, уровню экспрессии аргиназы-1 в MDSCs, активности сукцинатдегидрогеназы в Treg) в оценке стадии заболевания и эффективности лечения биологическими препаратами.

Впервые установлено, что активация течения иммунозависимых заболеваний сопровождается уменьшением содержания белков I-III комплексов окислительного фосфорилирования и увеличением содержания глюкозо-6-фосфат изомеразы, транскетолазы, фактора транскрипции HIF1- $\alpha$ , усиливающих процессы гликолиза в лимфоцитах периферической крови.

Впервые проведен сравнительный анализ циркулирующих цитокинов и цитокиновых комплексов, ассоциированных с клетками-продуцентами и с их функциями, в зависимости от формы патологии, стадии заболевания и эффективности биологических препаратов. В фазе обострения воспалительных заболеваниях кишечника, вульгарного псориаза у детей обнаружено повышение концентрации комплексов цитокинов, связанных с M1 макрофагами (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), Т-хелперами 1 типа (IFN- $\gamma$ , IL-12p70, TNF- $\beta$ , IL-2), Th17-лимфоцитами (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, IL-17-F, IL-21, IL-22, IL-23), Th2-клетками (IL-4, IL-5, IL-13, IL-17E/IL-25, IL-33), у детей с ремиттирующим рассеянным склерозом – комплексы M1 и Th1, что подтверждает значимость Th1-клеток, M1 макрофагов, Th17- и Th2-клеток в иммунопатогенезе изученных патологий. Превышение показателей, указанных цитокиновых комплексов, выше пороговых уровней является значимым лабораторным предиктором неэффективности биологической терапии в период поддерживающего курса.

Впервые продемонстрировано, что у детей с иммунозависимыми заболеваниями при снижении процессов окислительного фосфорилирования и интенсификации гликолиза в популяциях лимфоцитов (снижение соотношения сукцинатдегидрогеназы и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы) сопровождается значительным ростом уровня патогенетически значимых цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CCL20/MIP3 $\alpha$ ) в крови, что подтверждает функциональную связь между внутриклеточным метаболизмом иммунных клеток и интенсивностью цитокинового ответа.

Впервые показано, что активность ядерного фактора транскрипции  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) зависит от популяции клеток (в В-лимфоцитах значимо выше, чем в Т- и НК-клетках), от фазы течения заболевания (в обострении выше, чем в ремиссии при воспалительных заболеваниях кишечника и псориазе во всех изученных популяциях лимфоцитов, при рассеянном склерозе – в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, НК-клетках, цитотоксических Th17-лимфоцитах), от формы патологии (при воспалительных заболеваниях кишечника выше, чем при псориазе и рассеянном склерозе). Увеличение содержания клеток с транслокацией NF- $\kappa\text{B}$  в популяции НК-клеток выше пороговых значений отражает активацию воспалительного процесса.

Впервые установлено, что положительный клинический ответ у пациентов при лечении анти-TNF препаратами определяется более высокой активностью ядерного фактора транскрипции  $\kappa\text{B}$  до начала терапии и значимым снижением доли клеток с транслокацией NF- $\kappa\text{B}$  через 24 часа после введения блокаторов TNF в основных и малых Т- лимфоцитах (Th17, Thact, Tc17).

Доказана необходимость проактивного (непосредственно перед плановым введением препарата) и реактивного терапевтического лекарственного мониторинга (при обострении заболевания) остаточного уровня блокаторов TNF в сыворотке крови пациентов для повышения эффективности лечения.

Впервые показано, что детям с болезнью Крона и язвенным колитом с массой тела <40 кг для достижения клинической и эндоскопической ремиссии необходимы более высокие концентрации адалимумаба в сыворотке, чем пациентам с массой тела >40 кг.

Впервые установлено, что выживаемость биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями зависит от формы патологии, возраста больных, применяемого препарата, предшествующей биологической терапии, применения дополнительных иммунодепрессантов и иммунологических показателей.

Впервые разработан оригинальный алгоритм иммунологического обследования детей с воспалительными заболеваниями кишечника, псориазом и рассеянным склерозом для прогноза эффективности лечения биологическими препаратами, включающий оценку индекса Th17/Treg, активности сукцинатдегидрогеназы в Treg, содержания Treg с экспрессией CD39, уровня транслокации NF- $\kappa\text{B}$  в НК-клетках, содержания наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти, содержания регуляторных клеток (сумма MDSCs и Treg), остаточного уровня инфликсимаба и адалимумаба (при воспалительных заболеваниях кишечника).

## Теоретическая и практическая значимость

Значимость работы заключается в расширении знаний о популяционном составе клеток врожденного и адаптивного иммунитета, участвующих в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника, вульгарного псориаза и ремиттирующего рассеянного склероза. Показана информативность определения соотношения Th17-лимфоцитов к регуляторным Т-клеткам, содержания популяций клеток супрессоров миелоидного происхождения (MDSCs), субпопуляций Т-клеток памяти в прогнозировании риска неэффективности биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями до начала лечения и во время поддерживающего курса.

В ходе исследования были установлены закономерности, обосновывающие необходимость комплексной оценки функционального статуса иммунных клеток для оценки тяжести воспалительного процесса и прогноза эффективности биологических препаратов при воспалительных заболеваниях кишечника, псориазе и рассеянном склерозе. Обоснована диагностическая и прогностическая ценность определения: метаболической активности лимфоцитов (по активности сукцинатдегидрогеназы и глицерофосфатдегидрогеназы); доли регуляторных клеток и эффекторных Th17-лимфоцитов, экспрессирующих внеклеточные ферменты CD39 и CD73; супрессорного потенциала MDSCs по экспрессии внутриклеточного фермента (аргиназы-1).

В работе проанализированы изменения отдельных цитокинов и сформированы цитокиновые комплексы, отражающие активность патологического процесса и изменяющиеся в зависимости от эффекта терапии при разных формах патологии.

Проведенное исследование показало необходимость проведения терапевтического лекарственного мониторинга остаточного уровня блокаторов TNF и антилекарственных антител у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Получены пороговые значения остаточного уровня инфликсимаба и адалимумаба для пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом, выше которых можно прогнозировать ремиссию заболевания. Остаточный уровень блокаторов TNF определяется формой патологии (при болезни Крона более высокие уровни ГИБП, чем при язвенном колите), массой тела пациента (детям с массой тела менее 40 кг требуются большие дозы ГИБП), применением дополнительных иммунодепрессантов (терапия азатиоприна в комбинации с ГИБП ассоциирована с более высоким остаточным уровнем).

Исследование выявило, что выживаемость биологической терапии зависит от формы патологии (при болезни Крона и язвенном колите), возраста пациента (при ВЗК и ПС), применяемого препарата (при ВЗК), предшествующей биологической терапии (при ВЗК), использования дополнительных иммунодепрессантов (при ВЗК и ПС), а также иммунологических показателей (при ВЗК, ПС и РС).

Результаты исследования вносят существенный вклад в понимание ответной реакции клеток адаптивной и врожденной иммунной системы у детей с воспалительными

заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и ремиттирующим рассеянным склерозом при лечении биологическими препаратами.

На основании информативных критериев, полученных в диссертационной работе, разработан 2-х этапный алгоритм иммунологического обследования пациентов, позволяющий прогнозировать эффект от проводимой биологической терапии и выявлять пациентов с риском неэффективности до начала лечения и в период поддерживающего курса.

### **Внедрение результатов в практическое здравоохранение**

Результаты диссертационного исследования внедрены в клиническую практику отделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России: гастроэнтерологического отделения Центра воспалительных заболеваний кишечника у детей, отделения дерматологии и аллергологии НИИ детской дерматологии, отделения психоневрологии и нейрореабилитации Центра детской психоневрологии. Также, результаты диссертации внедрены в учебный процесс кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, в клиническую практику гастроэнтерологического отделения ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ», в отделение ГАУЗ «Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер» министерства здравоохранения Республики Татарстан (г. Казань), в педиатрическое отделение ГБУ РО «Областной детской клинической больницы» (г. Ростов-на-Дону).

### **Методология и методы исследования**

Исследование было выполнено в строгом соответствии с этическими принципами и одобрено Локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол № 9 от 10 июля 2020 г.).

Для обоснования гипотезы о прогностической ценности иммунологических параметров был проведён систематический поиск с анализом научных работ (фундаментальных и прикладных) отечественных и зарубежных авторов, посвящённых проблеме поиска биомаркеров для оценки активности иммуноопосредованных заболеваний и эффективности биологических препаратов в педиатрической практике. Для достижения цели данной научной работы был применён комплексный подход, сочетающий клинические протоколы и расширенный спектр современных лабораторных методов обследования пациентов, включающий оценку: клинических индексов активности, результатов функциональных методов исследования, показателей клеточного иммунитета с определением метаболической активности клеток, АТФ-азной активности эктонуклеотидазы CD39, содержания клеток с транслокацией NF-κB, концентраций циркулирующих цитокинов и комплексов цитокинов,

остаточного уровня блокаторов TNF в сыворотке крови (инфликсимаба/ адалимумаба) и антител к ним, влияния различных факторов на выживаемость биологической терапии (возраст пациента на момент инициации лечения, биологический препарат, дополнительные иммуносупрессоры). В исследовании проведено изучение диагностической значимости и возможности с помощью иммунологических показателей предсказывать эффект (достаточный, отсутствие эффекта) терапии генно-инженерных биологических препаратов у детей с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и ремиттирующим рассеянным склерозом. Анализ полученных данных проведен с использованием актуальных статистических программ. На основании всего вышперечисленного были сформулированы научно обоснованные выводы и создан оригинальный алгоритм иммунологического обследования пациентов с иммунозависимыми заболеваниями для прогноза эффективности лечения биологическими препаратами.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно выполнен аналитический обзор отечественных и зарубежных научных работ, на основании которого сформулированы цель, задачи исследования и выбрана соответствующая методология.

Автором проведена практическая часть работы, включающая анализ клинических, получение и обработку лабораторных показателей пациентов на различных этапах терапии генно-инженерными биологическими препаратами. В ходе диссертационного исследования выполнено: фенотипирование клеток периферической крови с определением основных и минорных субпопуляций лимфоцитов; определение содержания субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих внеклеточные ферменты пуринергической системы регуляции; исследование АТФ-азной активности эктонуклеотидазы CD39 в Treg-лимфоцитах; количественное измерение комплексов белков окислительного фосфорилирования и гликолиза, а также определение активности ферментов в лимфоцитах (сукцинатдегидрогеназы и  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы); исследование активности аргиназы-1 в миелоидных клетках-супрессорах; измерение концентрации инфликсимаба и адалимумаба, антител к ним в сыворотке крови; исследование концентрации цитокинов мультиплексным методом с использованием x-MAP технологии; определение уровня транслокации транскрипционного фактора  $\kappa B$  в популяциях лимфоцитов периферической крови с помощью проточной цитометрии с визуализацией (технология Amnis ImageStreamX); получены и проанализированы кривые выживаемости ГИБП у пациентов с ИЗЗ; проведен статистический анализ результатов, дано их описание в таблицах и представление в рисунках; разработан алгоритм иммунологического обследования для пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, псориазом, рассеянным склерозом перед началом лечения ГИБП и во время поддерживающего курса и на проверочных выборках пациентов проанализирована

прогностическая информативность иммунологических маркеров, вошедших в алгоритм. Автором самостоятельно написан текст диссертационной работы и автореферата.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. У детей с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и рассеянным склерозом количественные показатели иммунных клеток (отношение Th17-лимфоцитов к регуляторным Т-клеткам, содержание Т-клеток памяти, клеток-супрессоров миелоидного происхождения, регуляторных Т-клеток) и показатели функциональной состоятельности клеток (по активности внутриклеточных ферментов сукцинатдегидрогеназы и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в популяциях лимфоцитов, по экспрессии аргиназы-1 в миелоидных клетках-супрессорах, по экспрессии фермента NTPDase1 на поверхности регуляторных Т-лимфоцитов) являются прогностическими критериями эффективности биологической терапии.

2. Проведение мониторинга концентрации блокаторов фактора некроза опухоли и антител к ним у детей с воспалительными заболеваниями кишечника способствует оптимизации лечения и увеличению эффективности биологической терапии. Достаточный терапевтический остаточный уровень генно-инженерных биологических препаратов необходимый для достижения ремиссии заболевания определяется формой патологии.

3. Выживаемость терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом, ремиттирующим рассеянным склерозом зависит от формы патологии, возраста пациента, предшествующей биологической терапии, применения комбинированной терапии, иммунологических показателей.

4. Разработанный оригинальный алгоритм иммунологического обследования детей с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом, ремиттирующим рассеянным склерозом позволяет прогнозировать эффективность генно-инженерных биологических препаратов.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Направление диссертационного исследования соответствует п. 2 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии», п. 5 «Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний», п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов», п. 7 «Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий» паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология (медицинские науки); соответствует п. 3 «Оптимизация

научно-исследовательских подходов и практических принципов ведения – диагностики, профилактики, лечения, абилитации и реабилитации, а также сопровождения детей с хроническими рецидивирующими болезнями, острой патологией, подвергшихся воздействию внешних факторов, в том числе экологических и социальных. Формирование моделей и параметров оценки ведения пациента и подходов к аудиту осуществленного объема вмешательств и качества оказываемой медицинской деятельности» паспорта научной специальности 3.1.21. Педиатрия (медицинские науки).

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности результатов исследования обеспечена репрезентативными выборками пациентов, фактическим материалом (таблицы, рисунки) с представленными уровнями значимости, применением актуальных информативных методов исследования и использованием современных программ для статистического анализа данных.

Апробация диссертационного исследования проведена 17 июня 2024 года на совместном заседании проблемной комиссии по Педиатрии и сотрудников Лабораторного отдела Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения диссертации были доложены на научно-практических конференциях: X Всероссийская школа по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» (Пушкинские горы, 2019), XIV конгресс Европейской организации по вопросам болезни Крона и колитам (14th Congress of ECCO) (Копенгаген, Дания, 2019), Российская научная конференция «Актуальные вопросы детской гастроэнтерологии и питания» (Санкт-Петербург, 2019), ESPGHAN 52 Annual Meeting (Глазго, Шотландия, 2019), Научно-практический семинар «Визуализирующая проточная цитометрия в клинической практике и научных исследованиях» (Москва, 2019), 5 Российский конгресс по лабораторной медицине (Москва, 2019), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. Важные вопросы детского здоровья (Пенза, 2019), 15th Congress of ECCO (Вена, Австрия, 2020), XXVII Конгресс детских гастроэнтерологов России и стран СНГ (Москва, 2020), ESPGHAN 54th Annual Meeting (Копенгаген, Дания, 2022), VIII Российский конгресс лабораторной медицины (Москва, 2022), Восьмая научно-практическая школа-конференция с трансляцией в интернет Аллергология и клиническая иммунология (для практикующих аллергологов-иммунологов, инфекционистов, педиатров, терапевтов и гинекологов) (Сочи, 2022), V Всероссийский Съезд АДАИР (Москва, 2022), 19-ая Междисциплинарная конференция с международным участием, посвященная памяти академика А.М. Вейна (Москва, 2023), XXVIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Наукоемкие лабораторные технологии для клинической практики» (Москва, 2023), XVII Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе (Санкт-Петербург, 2023), IX Российский конгресс лабораторной медицины.

Российский диагностический саммит (Москва, 2023), X Всероссийский Конгресс АДАИР (Москва, 2023), «Школа здоровья детей, посвященная Всемирному дню иммунитета» (Москва, 2024), IV Всероссийский научно-практический форум с международным участием «Педиатрия сегодня и завтра» (Москва, 2024), Объединенный иммунологический форум (Псковская область, Пушкинские горы, 2024), XI Всероссийский конгресс АДАИР (Москва, 2024), XXX Всероссийская юбилейная научно-практическая конференция «Национальные традиции клинической лабораторной диагностики» (Москва, 2025), VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Осенние Филатовские чтения – важные вопросы детского здоровья» (Москва, 2025), V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «ОРФА-ДА. Редкие болезни: от истоков к перспективам» (Москва, 2025), XII Всероссийский конгресс АДАИР (Москва, 2025).

### **Публикации по теме работы**

По теме диссертации опубликовано 46 печатных работ: 26 статей в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций (8 статей в международных наукометрических базах данных Scopus, 2 статьи — Web of Science и Scopus); 2 статьи в периодических научных изданиях; 17 публикаций в материалах конгрессов и конференций (тезисы).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 552 страницах машинописного текста, включая 127 таблиц и 182 рисунка. В структуру работы входит: введение, 4 главы (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов), заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы из 643 источника (89 отечественных, 554 зарубежных).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы**

Исследование проведено на базе ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России (директор – заслуженный врач Российской Федерации, д.м.н., профессор А.П. Фисенко) у детей, проходивших лечение с 2020 г. по 2023 г., в подразделениях: гастроэнтерологическом отделении Центра воспалительных

заболеваний кишечника у детей (начальник центра, заведующий отделением – д.м.н., профессор А.С. Потапов), отделении дерматологии и аллергологии НИИ детской дерматологии (руководитель, заведующий отделением – д.м.н., профессор Н.Н. Мурашкин), отделении психоневрологии и нейрореабилитации Центра детской психоневрологии, (начальник центра, заведующая отделением – д.м.н., профессор Л.М. Кузенкова). Функциональные методы исследования проведены в подразделениях ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России: эндоскопические исследования – в лаборатории эндоскопических, морфологических и патологоанатомических исследований (заведующий отделением – д.м.н. М.М. Лохматов); МРТ головного и спинного мозга – в лаборатории лучевой и инструментальной диагностики (заведующий лабораторией – к.м.н., А.В. Аникин). Лабораторные исследования выполнены в подразделениях центра: клинко-диагностической лаборатории (заведующая лабораторией – к.м.н., С.С. Акулова) и лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии (и.о. заведующего лабораторией – к.м.н., О.В. Курбатова) лабораторного отдела (заведующая отделом – д.м.н., Е.Л. Семикина); лаборатории нейробиологии и основ развития мозга (и.о. заведующего лабораторией – к.м.н., З.В. Бакаева).

Исследование получило одобрение Локального этического комитета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол № 9 от 10 июля 2020 г).

В работе обследовано 915 детей в возрасте от 3,5 до 18 лет, из них 486 пациентов с ВЗК (с БК – 297, с ЯК – 189), 182 ребёнка с вульгарным псориазом, 147 детей с рассеянным склерозом. Группу сравнения составили 100 здоровых детей. Длительность заболевания у детей с исследованными патологиями составила: для БК – от 0,1 до 17,7 лет; для ЯК – от 0,3 до 16,8 лет; для ПС – от 0,4 до 13 лет; для РС – от 0,2 до 8,2 лет. Пациенты с ИЗЗ находились на лечении биологическими препаратами согласно существующим стандартам: пациенты с ВЗК – блокаторами TNF (IFX/ADA), пациенты с ПС – ADA, пациенты с РС – INFβ-1a. Длительность терапии ГИБП составила: для БК на IFX от 0 до 434 недель; для ЯК на IFX от 0 до 316 недель; для БК на ADA от 0 до 418 недель; для ЯК на ADA от 0 до 300 недель; для ПС на ADA от 0 до 222 недель; для РС на INFβ-1a от 0 до 372 недель. Часть пациентов получала комбинированную терапию ГИБП с дополнительными иммуносупрессорами: азатиоприн получали 80 % пациентов с ВЗК при лечении IFX и 46 % пациентов с ВЗК при терапии ADA; метотрексат – 45% пациентов с ПС.

Активность заболевания у пациентов с ВЗК и ПС оценивали с помощью специальных клинических индексов: при БК – Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI), при ЯК – Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI); при ПС – Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Body Surface Area (BSA, %). При ВЗК активность заболевания оценивалась также с помощью эндоскопических индексов: при БК – SES-CD (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease), при ЯК – USEIC (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity). При БК сумма баллов PCDAI не более 10 баллов соответствовала клинической ремиссии, 11-30 баллов – низкой активности, более 30 баллов – умеренной/высокой активности заболевания. При ЯК сумма баллов не более 10 баллов соответствовала клинической ремиссии, 11-34 балла – низкой

активности, 35-64 балла – умеренной активности, свыше 65 баллов – высокой. Сумма баллов  $\leq 2$  и от 0 до 1 по шкалам SES-CD/ USEIC соответственно расценивалась как эндоскопическая ремиссия. Индексы активности у пациентов с ВЗК составляли: PCDAI – 20,0 [15,0-25,0], PUCAI – 25,0 [15,0 – 35,0]. Тяжесть течения заболевания при РС с учетом индексов PASI/BSA определялась:  $\leq 10$  баллов /  $< 3\%$  – легкая; 10-19 баллов /  $< 10\%$  – среднетяжелая;  $> 20$  баллов /  $> 10\%$  – тяжелая. Индексы активности у пациентов с псориазом составляли: PASI – 13,9 [8,8-19,7]; BSA – 19,0 [11,0-28,0]. Клиническая активность пациентов с РС оценивалась с учётом клинической симптоматики, шкалы инвалидизации EDSS (Expanded Disability Status Scale), лабораторных показателей, наличия или отсутствия активных очагов демиелинизации по результатам МРТ головного и спинного мозга. У пациентов с РС индекс EDSS изменялся от 1 до 4,5 баллов.

В обострении ИЗЗ обследовано 159 детей с БК, 111 – с ЯК, 92 – с ПС, 51 – с РС. В ремиссии ИЗЗ обследовано пациентов 138 детей с БК, 78 – ЯК, 90 – с ПС, 96 – с РС.

Пациенты были поделены на группы в зависимости от эффективности терапии ГИБП к 52 неделе лечения. В группу с эффективностью терапии относили детей: при ВЗК – индексы активности PCDAI/PUCAI  $\leq 10$  баллов, без отклонений по лабораторным показателям (общий анализ крови, С-реактивный белок, фекальный кальпротектин), без эндоскопической активности (SES-CD  $\leq 2$  балла, USEIC- 0-1 балла); при ПС – достижение PASI 75 (снижение PASI  $\geq 75\%$  от исходных значений до начала терапии); при РС – отсутствие нарастания EDSS, отсутствие активных очагов по МРТ, отсутствие клинической симптоматики. В группах с эффективностью терапии обследовано: с БК – 103 ребёнка, с ЯК – 70 детей, с ПС – 52 ребёнка, с РС – 54 ребёнка. В группах с неэффективностью терапии (НЭ) обследовано пациентов: с БК – 66, с ЯК – 55, с ПС – 58, с РС – 40. Комплекс иммунологических показателей у детей оценивали до начала терапии и на разных этапах лечения – после индукционного курса, на 52 неделе, через 1-3 года.

**Имунофенотипирование клеточных популяций** в периферической крови с использованием моноклональных антител (МАТ), конъюгированных с различными флуорохромами (Beckman Coulter, США), проводили методом проточной цитометрии на приборе Novocyte (ACEA Biosciences, США) по стандартизованной технологии. Выделение популяций лимфоцитов осуществляли в результате пошагового гейтирования, начиная с региона CD45. Определяли следующие популяции лимфоцитов: Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперы (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> – CD4), Т-цитотоксические (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> – CD8), В-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> – CD19), НК-клетки (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> – NK), НКТ-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> – НКТ), активированные Т-хелперы (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup> – Thact), Т-регуляторные лимфоциты (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> – Treg), Th17-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> – Th17). Оценивали популяции Т-клеток памяти: наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки (TNAIVE) - CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup>; центральные CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти (TCM) – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup>; эффекторные CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти (TEM) – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>-</sup>; терминально-дифференцированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти (TEMRA) – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CD197(CCR7)<sup>-</sup>; наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти (TcytNAIVE) –

CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup>; центральные CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти (T<sub>scm</sub>) – CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup>; эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти (T<sub>em</sub>) – CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>-</sup>; терминально-дифференцированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти (T<sub>emRA</sub>) – CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CD197(CCR7)<sup>-</sup>. Анализировали содержание клеток-супрессоров миелоидного происхождения по следующему алгоритму: выделение мононуклеарных клеток; выделение популяции, не несущих линейных маркеров CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>- FITC (Lin<sup>-</sup>) и HLA-DR<sup>-</sup>(PE); выделение двойной позитивной популяции по CD33<sup>+</sup>(PC7) и CD11b<sup>+</sup>(APC-Cy7); выделение популяций по маркерам CD14<sup>+</sup>(PC5) и CD15<sup>+</sup>(APC-Cy7): мноцитарной M-MDSCs (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>-PC5), гранулоцитарной G-MDSCs (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>), субпопуляции незрелых MDSCs (M<sup>c</sup>G<sup>-</sup>) (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>-</sup>). В общей популяции MDSCs Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-low</sup> (FITC) CD33<sup>+</sup>(PC7) CD11b<sup>+</sup>(APC-Cy7) анализировали экспрессию внутриклеточного фермента аргиназы-1 (Arg-1-PE) по оценке средней интенсивности флуоресценции (MFI). Оценивали содержание популяций Treg, Thact, Th17 с экспрессией эктонуклеотидаз CD39(APC) и CD73 (APC-Cy7): CD39Treg, CD73Treg, CD39Thact, CD73Thact, CD39Th17, CD73Th17.

**Определение АТФ-азной активности регуляторных Т-клеток** проводили в суспензии Treg, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39 (CD39Treg). Суспензию клеток CD39Treg получали с помощью сортера клеток с использованием поверхностных маркеров CD4<sup>+</sup>(FITC)CD25<sup>+</sup>(PC7) CD127<sup>low</sup> (PE) CD39 (APC) (Sony SH800, США). Активность фермента определяли по снижению интенсивности люминесцентной реакции после добавления люциферин-люциферазы (rLuciferase/Luciferin Reagent – Promega, США), вызванной гидролизом АТФ под действием эктонуклеотидазы CD39 на поверхности Treg. Регистрацию люминесценции осуществляли на анализаторе Clariostar (Германия).

**Изучение активности митохондриальных ферментов сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) в популяциях лимфоцитов** у пациентов определяли методом проточной цитометрии (патент №2302635). Принцип метода основан на оценке изменения показателей гранулярности (SSC – Side Scatter) до и после проведения цитохимической реакции с помощью проточного цитометра. Активность ферментов оценивали в основных и малых CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах. Для постановки цитохимической реакции использованы коммерческие наборы реагентов (НИЦ «Курчатовский институт» – ИРЕА, Россия).

**Количественное определение цитокинов методом мультиплексного анализа** в сыворотках крови включало определение: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E / IL-25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28A, IL-31, IL-33, GM-CSF, IFN-γ, CCL20/MIP-3α, TNF-α и TNF-β с использованием набора реагентов MILLIPLEX MAP «Human Th17 Magnetic Bead Panel» (Millipore, США). Анализ образцов выполняли на анализаторе Bio-plex-200 (BIO-RAD, США).

**Количественное определение белков окислительного фосфорилирования методом мультиплексного анализа** в лизатах лимфоцитов проводили с помощью панели реагентов MILLIPLEX (OXPHOS) (EMD Millipore, США). Определяли содержание белков I комплекса

OXPPOS (НАДФ-убихинон оксидоредуктазы); II комплекса (сукцинат убихинон оксидоредуктазы); III комплекса (убихинон цитохром C оксидоредуктазы); IV комплекса (цитохром C оксидазы), V комплекса (АТФ-синтазы), а также никотинамид нуклеотид трансгидрогеназы. Считывание результатов проводили на анализаторе Bio-plex-200 (BIO-RAD, США).

**Количественное определение белков гликолиза методом мультиплексного анализа** в лизатах лимфоцитов проводили с использованием реагентов MILLIPLEX «Human Glycolysis Pathway Magnetic Bead Panel» (EMD Millipore, США). Определяли содержание белков: енолазы-1, глюкозо-6-фосфат изомеразы, M2 пируват-киназа, L-лактат дегидрогеназа (А цепь и В цепь), транскетолазы, а также фактора транскрипции – гипоксия-индуцируемый фактор 1-а. Считывание результатов проводили на анализаторе Bio-plex-200 (BIO-RAD, США).

**Концентрацию блокаторов TNF и антител к ним определяли** с помощью иммуноферментного анализа в формате 96-луночного планшета в предварительно собранных образцах сывороток (хранение при  $-70^{\circ}\text{C}$ ) с использованием реагентов Shikari (Matriks Biotek, Турция): Q-INFLIXI – для измерения уровня инфликсимаба (IFX), Q-ADA – для измерения уровня адалимумаба (ADA), Q-ATI – для измерения уровня антител к IFX, S-ATA – для измерения уровня антител к ADA. Считывание результатов осуществляли на мультискане (Tecan Infinite, Австрия).

**Концентрацию блокаторов TNF оценивали также экспресс-тестами (латеральный иммуноанализ)** с использованием наборов: для определения уровня IFX – «Quantum Blue Infliximab» (BUHLMANN, Германия), уровня ADA – «Quantum Blue Adalimumab» (BUHLMANN, Германия). Результат анализа оценивали с помощью QUANTUM BLUE ридера (BUHLMANN, Германия). Продолжительность исследования для 1 пациента составляла 30 минут.

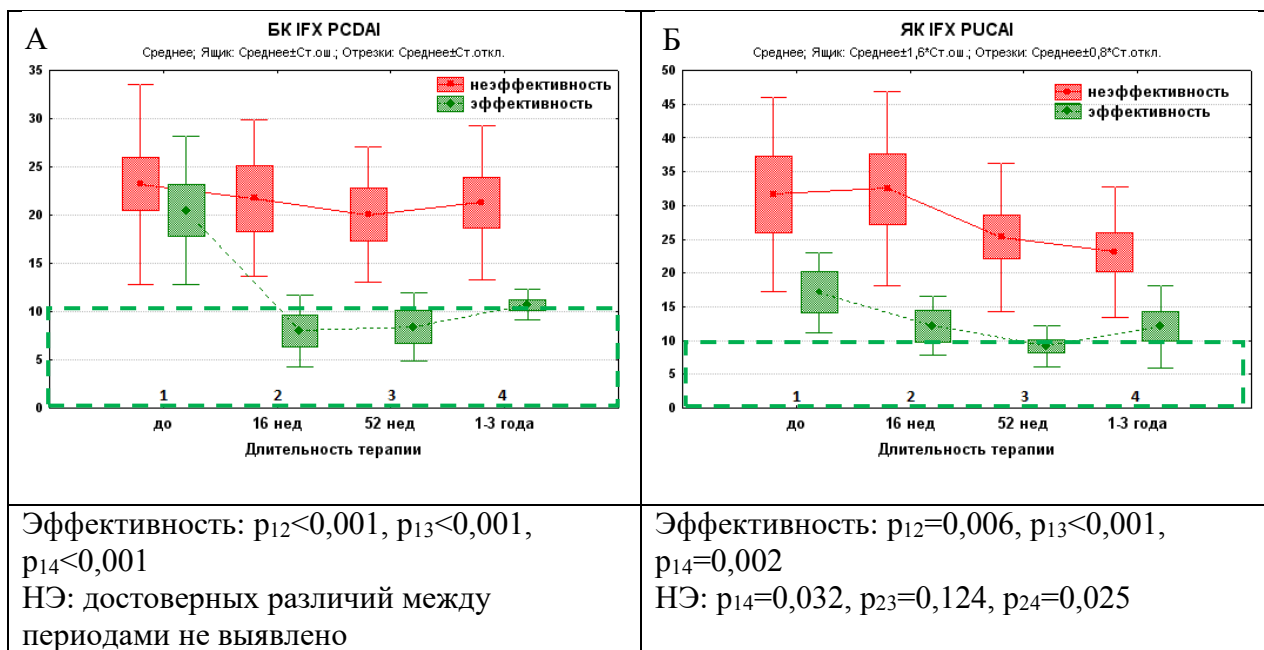
**Исследование активности NF-κB в популяциях лимфоцитов** проводили с помощью проточной цитометрии с визуализацией (AMNIS ImageStream, США). Для анализа использовали набор реагентов «Amnis NF-κB Translocation Kit» (Millipore, США). Принцип метода основывается на оценке количества клеток с транслокацией NF-κB из цитоплазмы в ядро. Для окрашивания ядра использовали 7-AAD краситель, для окрашивания субъединицы p50 фактора транскрипции κB – Anti-Hu NFκB Alexa Fluor 488. Образцы собирали при низкой скорости потока клеток, увеличении изображения – x40 (программное обеспечение «INSPIRE» - Amnis, Luminex Corporation, США). Обработку изображений и статистический анализ выполняли в программе «IDEAS 6.4» (Amnis, Luminex Corporation, США). Для выделения популяций лимфоцитов применяли метод последовательного гейтирования: выделяли клетки в фокусе на основе параметра «Gradient RMS»; отбирали одиночные клетки по параметру «Aspect Ratio RMS»; выделяли популяции лимфоцитов на основе поверхностных маркеров; отбирали двойные позитивные клетки, экспрессирующие NF-κB и 7-AAD; уровень транслокации NF-κB из цитоплазмы в ядро (% клеток) определяли с помощью коэффициента Similarity (подобие), отражающего степень колокализации NF-κB и 7-AAD. Активность NF-

кВ определяли в следующих популяциях: CD3<sup>+</sup> Т-клетках, В-лимфоцитах, Т-хелперах, Т-цитотоксических, NK-клетках, Treg, Thact, Th17-лимфоцитах, цитотоксических Th17-лимфоцитах (Tc17 – CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup>).

**Статистический анализ и методы представления данных.** Статистический анализ данных проведён с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США). Индивидуальные показатели обследованных пациентов были выражены в виде процента отклонения от возрастного референсного интервала, который принимался за 100%. Для оценки достоверности различий полученных результатов использовали непараметрические методы: критерий Вилкоксона (для сопряженных пар), критерий Манна-Уитни (для независимых пар), критерий Фишера и критерий  $\chi^2$  для сравнения распределений. Статистически значимыми принимали различия при  $p < 0,05$ . Исследование взаимосвязи показателей выполнено методом множественной пошаговой регрессии. ROC-анализ («SPSS 16.0», США) применён для расчёта площади под кривой (AUC), определения пороговых значений (cut-off), коэффициентов специфичности (Sp) и чувствительности (Se). Для графического представления данных по уровню цитокиновых комплексов была проведена z-стандартизация (z-оценка). Кривые выживаемости терапии строили методом суммарной кривой Каплан-Мейера, достоверность различий между кривыми оценивали критерием Гехана-Вилкоксона (Statistica 10.0, США). Для оценки вероятности хорошего прогноза с помощью иммунологических показателей определяли частоту верно предсказанных истинно положительных результатов и истинно отрицательных результатов из их общего числа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ динамики клинических индексов активности показал, что у пациентов с БК при лечении IFX в группе с НЭ достоверных отличий между периодами наблюдения по индексу PCDAI выявлено не было. В тоже время, у пациентов с эффективностью терапии показано достоверное снижение индекса PCDAI между периодом до начала терапии и остальными периодами лечения (Рисунок 1А). Группы с разной эффективностью у пациентов с ЯК отличались по индексу PUCAI до начала лечения: более высокие значение PUCAI выявлены в группе с НЭ (Рисунок 1Б). В этой группе наблюдалось снижение индекса PUCAI между периодами до назначения ГИБП и периодом 1-3 года, но при этом индекс активности оставался достоверно выше, чем в группе с эффективным лечением и составлял 20,0 - [15,0-30,0] против 10,0 [5,0-10,0] ( $p < 0,001$ ), что отражало сохраняющуюся активность воспалительного процесса. У пациентов с ЯК с эффективностью IFX выявлено достоверное снижение индекса PUCAI между периодами наблюдения, как и у пациентов с БК для PCDAI до уровня показателей клинической ремиссии. У пациентов с БК и ЯК при лечении ADA выявлены аналогичные изменения клинических индексов PCDAI /PUCAI в группах с разной эффективностью терапии.



Примечание: \* – достоверность различий с  $p<0,05$  между группами с разной эффективностью IFX в разные периоды наблюдения

Рисунок 1 – Динамика клинических индексов активности PCDAI /PUCAI у пациентов с БК (А) и у пациентов с ЯК (Б) при разной эффективности терапии IFX

У пациентов с ПС анализ динамики индекса PASI показал значимое снижение в группе пациентов с эффективностью ADA в течении всего периода наблюдения и отсутствие изменения индекса PASI между периодами лечения у пациентов, которые не достигли PASI 75. К году терапии индекс PASI в группе с НЭ был значимо выше, чем в группе с эффективностью ADA (10,8 [4,8-22,1] против 6,0 [1,4 - 9,8],  $p<0,001$ ).

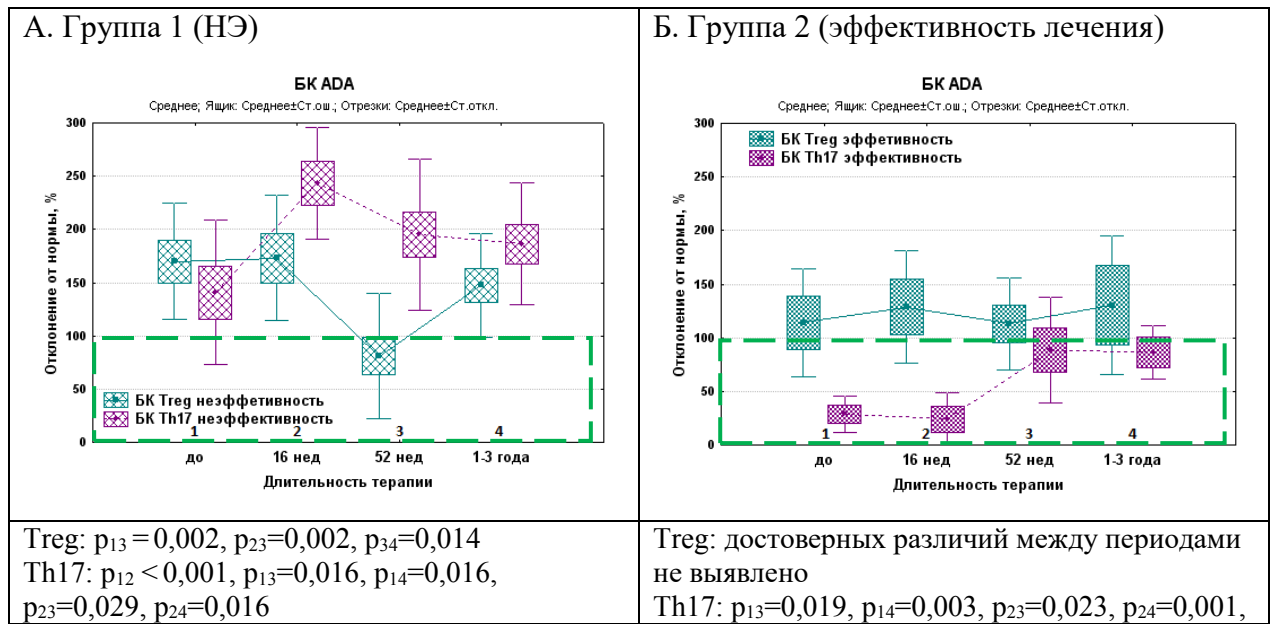
У пациентов с РС при лечении  $INF\beta-1a$  в группе с эффективностью терапии индекс инвалидизации  $EDSS>1$  наблюдался в меньшем проценте случаев, чем в группе с неэффективным лечением до назначения терапии (31% против 42%) и в период поддерживающего курса (31% против 48%). В группе с эффективностью  $INF\beta-1a$  в период поддерживающего курса процент пациентов с активными очагами демиелинизации по МРТ был значительно ниже (28 %), чем в группе с неэффективностью терапии (80%).

#### **Показатели клеточного иммунитета в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями**

Проведённое исследование популяционного состава лимфоцитов у пациентов с ВЗК к году терапии блокаторами TNF показало значимое увеличение относительного содержания  $CD4^+$  Т-лимфоцитов (в среднем на 72%) и снижение относительного содержания NK-клеток (в среднем на 38%) в циркуляции по сравнению с возрастными референсными значениями независимо от эффективности ГИБП. Аналогичная динамика  $CD4^+$  Т-лимфоцитов и NK-клеток выявлена у детей с псориазом при лечении ADA и рассеянным склерозом при терапии  $INF\beta-1a$ .

Анализ содержания малых популяций  $CD4^+$  Т-лимфоцитов показал, что у пациентов с ВЗК в группе с неэффективностью терапии IFX/ADA содержание Th17-лимфоцитов было значимо выше, чем в группе с эффективностью на протяжении всего периода наблюдения. В

группе пациентов с БК и ЯК при эффективности лечения содержание Th17-лимфоцитов соответствовало возрастной норме, а при НЭ – превышало показатели референсного диапазона (Рисунок 2).



Примечание: p – достоверность отличий между разными периодами наблюдений; диапазон нормы указан штриховкой

Рисунок 2 – Динамика показателей Treg и Th17 у пациентов с БК в группе с недостаточной эффективностью ADA (А) и в группе с эффективностью ADA (Б)

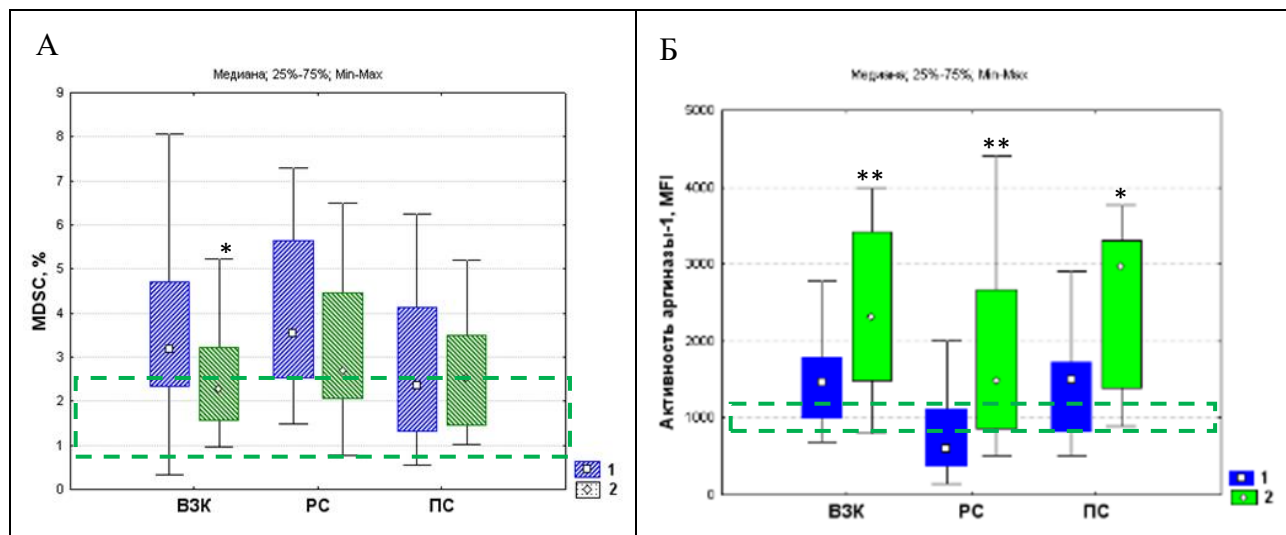
Относительное содержание Treg у пациентов с БК и ЯК независимо от эффективности терапии и применяемого блокатора TNF соответствовало или превышало значения возрастного референсного диапазона.

У пациентов с псориазом при лечении ADA и у пациентов с РС при лечении INFβ-1a в группах с НЭ показано достоверное увеличение содержания Th17-лимфоцитов относительно групп с эффективным лечением на протяжении всего периода наблюдения. Содержание популяции Treg у пациентов РС независимо от клинического ответа не отличалось от группы сравнения, а у пациентов с ПС сопровождалось значимым снижением к году лечения в группе с НЭ ( $p < 0,001$ ).

Установлены пороговые значения для соотношения Th17/Treg в разделительной модели «эффективность-неэффективность» в разных возрастных группах во время поддерживающего курса у пациентов обследованных патологий, превышение которых позволяет прогнозировать снижение эффективности ГИБП. Данный показатель у пациентов с ВЗК при лечении IFX составлял (cut-off (AUC, Se/Sp %)): в группе 6-12 лет – 1,92 (0,848; 73/71); в группе старше 12 лет – 2,04 (0,960; 85/83). У пациентов с ВЗК при лечении ADA пороговые значения индекса Th17/Treg составляли: в группе 6-12 лет – 1,8 (0,889; 80/78); старше 12 лет – 2,21 (0,895; 85/73). У пациентов с ПС при лечении ADA пороговые значения индекса Th17/Treg составляли: в группе 6-12 лет – 2,42 (0,836; 78/73); старше 12 лет – 2,48 (0,929; 86/85). У пациентов с РС при лечении INFβ-1a уровень cut-off индекса Th17/Treg в группе старше 12 лет составлял 2,75 (0,881; 66/94). Наибольшие соотношения Th17/Treg, выше

которых можно прогнозировать развитие неэффективности, наблюдалось в возрастной группе от 6 до 12 лет у пациентов с ПС и в возрастной группе старше 12 лет у пациентов с РС.

У пациентов обследованных патологий независимо от тяжести состояния (обострение/ремиссия) установлено более высокое относительное и абсолютное содержание общей популяции MDSCs относительно группы сравнения (Рисунок 3А).



Примечание: 1 – обострение, 2 – ремиссия; \* - достоверные отличия между группами с  $p < 0,05$ , \*\* – достоверные отличия между группами с  $p < 0,001$

Рисунок 3 – Относительное содержание MDSCs (А) и активность аргиназы-1 (Б) у пациентов с ВЗК, РС, РС

Среди пациентов с ВЗК, РС и РС наибольшие значения абсолютного содержания MDSCs отмечались у пациентов в обострении ВЗК (104 [54-166] кл/мкл), а наибольшие значения относительного содержания MDSCs – у пациентов в обострении РС (3,5 [2,5-5,6] % от МНК). Анализ отдельных субпопуляций MDSCs показал, что в обострении заболевания у детей с ВЗК наблюдалось повышение моноцитарной субпопуляции MDSCs, у пациентов с РС – гранулоцитарной субпопуляции MDSCs относительно группы сравнения.

Анализ функциональной активности миелоидных клеток-супрессоров по содержанию внутриклеточного фермента аргиназы-1 выявил значимое увеличение данного показателя в состоянии ремиссии заболевания относительно состояния обострения и группы сравнения при всех обследованных патологиях. У пациентов с РС активность Arg-1 в обострении заболевания была достоверно ниже, чем в группах пациентов с ВЗК ( $p_{\text{ВЗК\_РС}} < 0,001$ ), РС ( $p_{\text{РС\_РС}} < 0,001$ ) и (Рисунок 3Б).

Сравнительный анализ суммы абсолютного содержания MDSCs и Treg (Reg-клетки) между группами пациентов с ВЗК, РС и РС при разной эффективности лечения показал следующее: до назначения ГИБП в группах с НЭ выявлены достоверно более высокие значения у пациентов с ВЗК по сравнению с пациентами с РС, в группах с эффективностью терапии – значимо более высокое количество Reg-клеток у пациентов с ВЗК по сравнению с пациентами с РС и РС; к году терапии в группе с НЭ – достоверно большие значения у пациентов с ВЗК по сравнению с пациентами с РС и РС, в группе с эффективностью – достоверно большие значения у пациентов с РС относительно пациентов с ВЗК и РС (Рисунок 4).

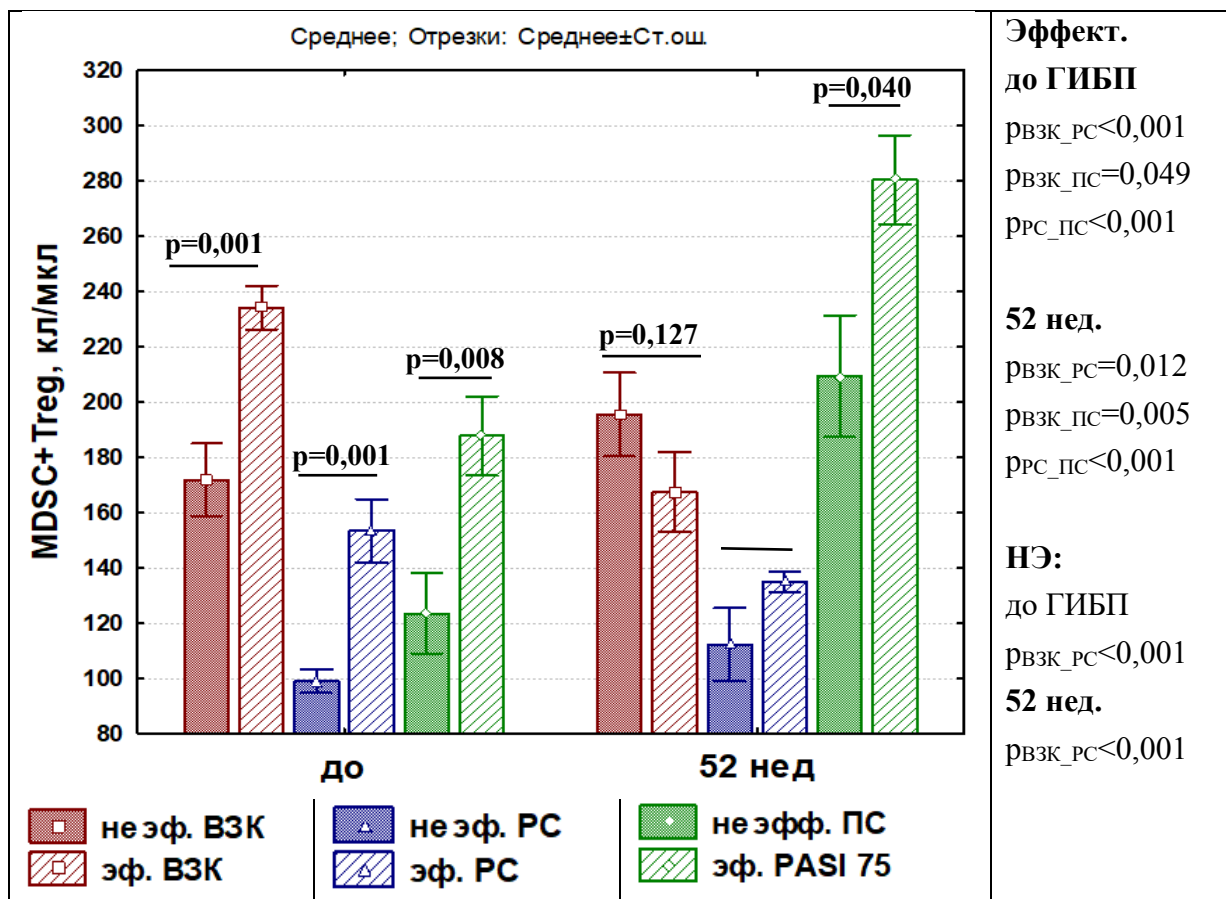


Рисунок 4 – Абсолютное содержание регуляторных клеток при ИЗЗ до назначения ГИБП и в год терапии

Наименьшее абсолютное содержание Reg-клеток как в группах с НЭ, так и в группах с эффективностью терапии выявлено у пациентов с РС до назначения и к году терапии. Получены пороговые значения для абсолютного количества Reg-клеток в разделительной модели «эффективность-неэффективность» до назначения ГИБП, ниже которых можно прогнозировать недостаточную эффективность биологической терапии у пациентов с ИЗЗ к году терапии. Наименьшее пороговое значение Reg-клеток определено у пациентов с РС (cut-off (AUC, Se/Sp %) – 117 кл/мкл (0,819; 69/80), а наибольшее у пациентов с ВЗК – 213 кл/мкл (0,813; 71/71). У пациентов с ПС пороговое значение для Reg-клеток составило – 145 кл/мкл (0,714; 64/ 67).

Оценка содержания популяций Т-клеток памяти показала, что с возрастом у обследованных детей наблюдалось: уменьшение популяции наивных  $CD4^+$  Т-клеток (TNAIVE) и увеличение центральных  $CD4^+$  Т-клеток памяти (TCM), уменьшение популяции наивных клеток  $CD8^+$  Т-клеток (TcytNAIVE), увеличение центральных (TcytCM) и эффекторных (TcytTEM)  $CD8^+$  Т-клеток памяти у пациентов с ВЗК и ПС.

Оценка содержания Т-клеток памяти от индексов клинической активности показала уменьшение количества популяции TNAIVE и увеличение популяций TCM и TEM у детей с ВЗК при повышении индексов активности PDAI/PUCAI ( $p<0,001$ ). У пациентов с ПС также выявлено снижение содержания популяции TNAIVE ( $p=0,040$ ) и повышение популяции TCM ( $p<0,001$ ) при увеличении индекса PASI. У пациентов с РС при обострении заболевания

(наличие активных очагов демиелинизации по МРТ) снижалось содержание популяции наивных цитотоксических Т-клеток (TcytNAIVE,  $p=0,002$ ) и увеличивалось содержание популяции эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти ( $p=0,023$ ).

Установлено, что у детей с ВЗК, ПС и РС независимо от формы патологии и применяемого ГИБП в группах с эффективностью биологической терапии содержание наивных Т-клеток было выше, а Т-клеток памяти ниже, по сравнению с пациентами с недостаточным эффектом лечения. Однако, необходимо отметить, что в группах с хорошим эффектом биологической терапии после индукционного курса у пациентов с ВЗК и ПС происходило повышение доли популяции наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток при снижении доли популяции центральных CD4<sup>+</sup> и эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, а у пациентов с РС снижение доли популяции наивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток при снижении CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти. У пациентов с ВЗК, ПС и РС во время поддерживающего курса ГИБП получены пороговые значения для наивных Т-клеток, при превышении которых можно прогнозировать эффективность проводимой биологической терапии, а также определены пороговые значения для популяций клеток центральной, эффекторной и терминально-дифференцированной памяти, при превышении которых можно ожидать неэффективность терапии. Пороговые значения для пациентов с ВЗК составили (cut-off, % от CD4<sup>+</sup> Т-клеток (AUC, Se/Sp %)): TNAIVE – 58,1 % (0,807, 70/83) (Рисунок 5А); TcytNAIVE – 53,1 % (0,873, 82/ 81) (Рисунок 5А); TCM – 23,2 % (0,915, 86/85); TcytEMRA – 17,1 % (0,811, 72/ 70). Пороговые значения для пациентов с РС составили: TcytNAIVE – 42,4 % (0,903, 93/ 75); TEM – 19,5 % (0,909, 83/83); TcytEMRA – 21,5 % (0,811, 75/77) (Рисунок 5Б). Пороговые значения для пациентов с ПС составили: TNAIVE – 58,9 % (0,860, 85/ 77); TCM – 22,2 % (0,765, 77/68); TEM – 12,9 % (0,819, 74/74). Для детей с ВЗК и ПС большую информативность продемонстрировали CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти, а для пациентов с РС – CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти.

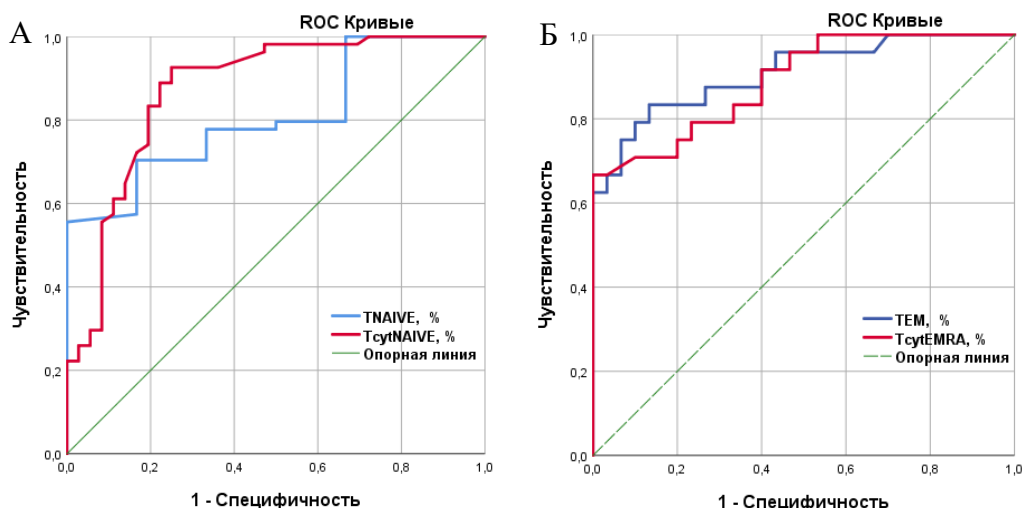
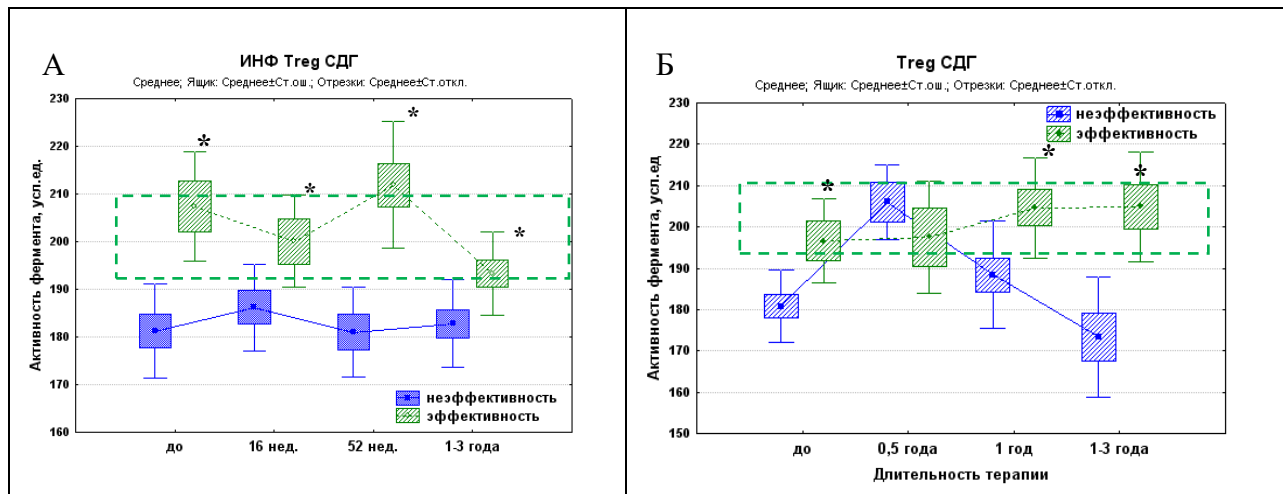


Рисунок 5 – ROC-кривые разделительной модели состояний «эффективность – неэффективность» для популяций клеток памяти TNAIVE, TcytNAIVE (А) у пациентов с ВЗК и популяций TEM, TcytEMRA у пациентов с РС (Б) после индукционного курса

## Метаболическая активность популяций лимфоцитов в прогнозе эффективности биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями

У пациентов с ИЗЗ в группах с недостаточной эффективностью выявлена достоверно более низкая активность СДГ в патогенетически значимых популяциях лимфоцитов – Treg и Th17-лимфоцитах во все периоды введения ГИБП относительно групп с эффективным лечением, кроме пациентов с РС после индукционного курса INFβ-1a (Рисунок 6).



Примечание: \* –  $p < 0,05$  между группами с разной эффективностью ГИБП

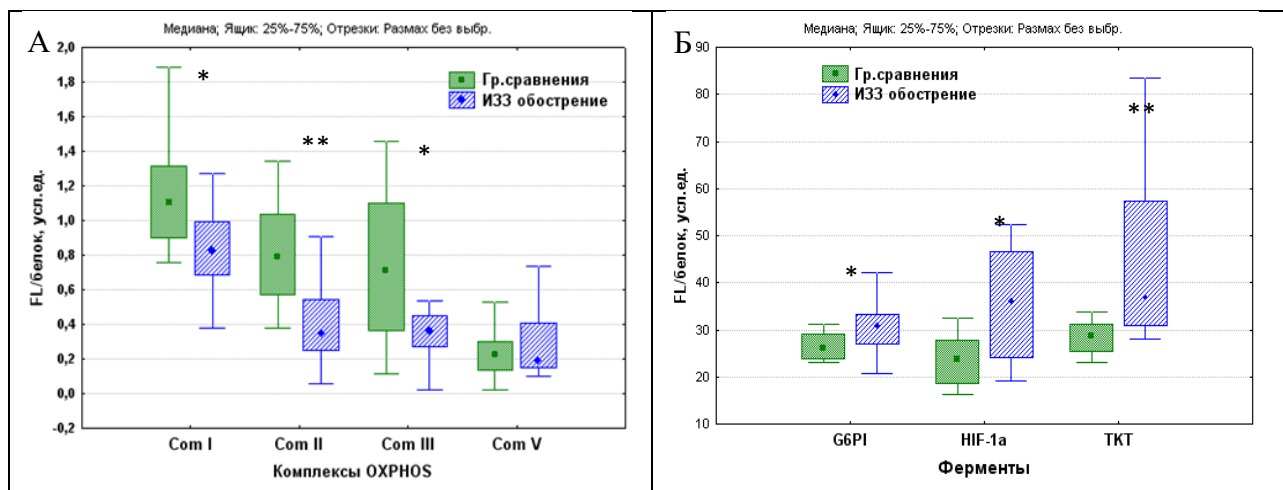
Рисунок 6 – Динамика активности СДГ в Treg при лечении ГИБП у пациентов с ВЗК (А), у пациентов с РС (Б) при разной эффективности терапии

Определены пороговые значения активности ферментов СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов, ниже которых можно прогнозировать недостаточную эффективность от проводимой терапии ГИБП. Признаком недостаточного ответа на биологическую терапию является снижение активности СДГ в популяциях регуляторных Т-клеток у пациентов с ИЗЗ до назначения терапии ГИБП (cut-off (AUC, Se/Sp)): у пациентов с ВЗК при лечении IFX менее 185 усл.ед (0,812, 82/67), у пациентов с ВЗК при лечении ADA в Treg менее 186 усл.ед (0,794, 82/67); у пациентов с РС при лечении ADA менее 193 усл.ед. (0,810, 71/67); у пациентов с РС при лечении INFβ-1a менее 187 усл.ед. (0,878, 75/77). Дополнительным показателем риска развития недостаточной эффективности лечения у пациентов с РС являются снижение активности СДГ менее 181 усл.ед. (0,866, 88/91) и ГФДГ менее 173 усл.ед. (0,852, 75/91) в популяции NK-клеток, а также снижение ГФДГ в Treg менее 168 усл.ед. (0,761, 75/91).

Предиктором потери эффекта ГИБП в период поддерживающего курса является снижение активности СДГ в Treg у пациентов с ВЗК при лечении IFX в Treg < 188 усл.ед (0,824, 76/68), в Th17-лимфоцитах < 179 усл.ед. (0,806, 74/68); у пациентов с ВЗК при лечении ADA в Treg < 189 усл.ед (0,810, 71/70); у пациентов с РС – в популяции Т-хелперов < 186 усл.ед. (0,817, 79/75), в Treg - 184 усл.ед. (0,841, 91/75).

Количественный анализ белков окислительного фосфорилирования и гликолиза в лизатах лимфоцитов у пациентов в обострении ИЗЗ по сравнению с группой сравнения выявил достоверное снижение белков окислительного фосфорилирования первых 3-х комплексов (НАД\*Н - убихинон оксидоредуктазы – на 28%, сукцинат убихинон оксидоредуктазы – 56 %, убихинон цитохром С оксидоредуктазы – 49%) и увеличение содержания белков гликолиза

(глюкозо-6-фосфат изомеразы - на 18%, гипоксия-индуцируемого фактора 1-альфа (HIF-1a) – на 50% и транскетолазы – на 28%) (Рисунок 7).



Примечание: \* – достоверность различий между группами,  $p < 0,05$ ;

\*\* – достоверность различий между группами,  $p < 0,001$ ; показатели HIF-1a представлены в усл.ед \* 100, TKT – в усл.ед / 2

Рисунок 7 – Содержание белковых комплексов OXPHOS (А) и гликолиза (Б) в группе сравнения и у пациентов с ИЗ3 в обострении заболевания

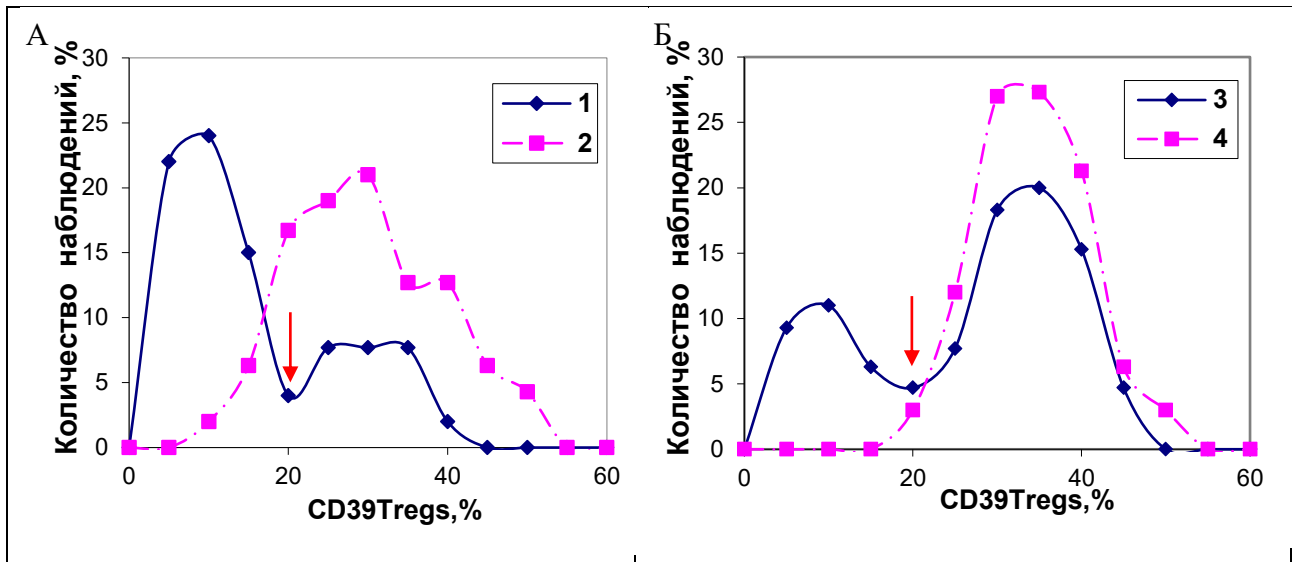
Сравнение активности СДГ, определённой иммуноцитохимическим методом, и количество белка II комплекса OXPHOS по результатам мультиплексного анализа показало хорошее соответствие показателей –  $r=0,68$ ,  $p=0,004$ .

#### Оценка содержания малых популяций CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями

Наибольшее относительное содержание лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 выявлено в популяции Treg и составляло Me ( $Q_{0.25}-Q_{0.75}$ ): у пациентов ВЗК – 34,2 [28,6-44,3] % от Treg; у пациентов с ПС – 32,2 [23,2-41,8] % от Treg; у пациентов с РС – 29,3 [15,0-37,6] % от Treg. Наибольшее содержание лимфоцитов с экспрессией CD73 получено в активированных Т-хелперах и составляло: у пациентов с ВЗК – 21,8 [16,4-28,9] %; у пациентов с ПС – 19,2 [15,2-24,1] %; у пациентов с РС – 13,9 [9,4-21,1] % от Thact.

Выявлено достоверное снижение содержания CD39Treg у пациентов с болезнью Крона и рассеянным склерозом в обострении заболевания относительно ремиссии ( $r_{БК} < 0,001$ ;  $r_{РС} < 0,05$ ).

Анализ распределения содержания CD39Treg у детей с ИЗ3 показал, что как в обострении, так и в ремиссии заболевания были выявлены пациенты с высоким (более 20% от Treg) содержанием CD39 (Рисунок 8). Однако, при всех изученных патологиях наибольший процент пациентов с CD39Treg > 20% выявлен в ремиссии заболевания (82% при БК, 100% при ЯК, 90 % при ПС, 85% при РС).



Примечание: 1 – пациенты с БК в обострении заболевания, 2 – пациенты с БК в ремиссии заболевания, 3 – пациенты с ЯК в обострении заболевания, 4 – пациенты с ЯК в ремиссии заболевания. На графиках А и Б по оси ординат – % пациентов

Рисунок 8 – Распределение пациентов с ВЗК по содержанию регуляторных Т-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39, в обострении и ремиссии заболевания

С помощью люциферин-люциферазного теста у пациентов выявлено, что популяция клеток CD39Treg пациентов в ремиссии заболевания обладала большей гидролазной активностью, чем в обострении заболевания. Под действием фермента CD39 концентрация АТФ через 5 минут реакции снижалась на 45% в образцах клеток пациентов в ремиссии и на 33% – в обострении заболевания. Причём АТФ-азная активность эктонуклеотидазы CD39 обратно зависела от количества клеток CD39Treg.

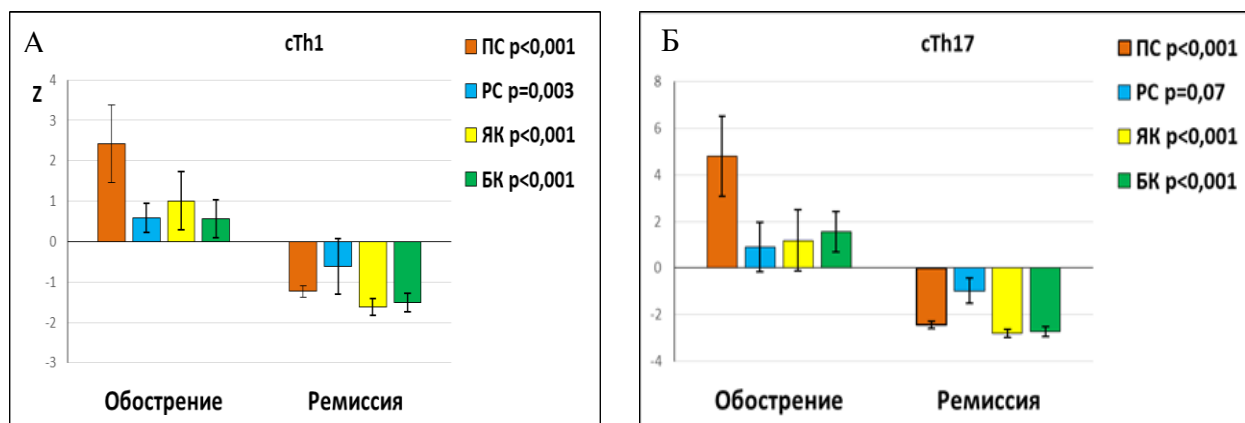
У пациентов всех обследованных патологий (ВЗК, ПС, РС) в группах с эффективным лечением ГИБП к году терапии содержание клеток с экспрессией CD39 в популяциях Т-регуляторных и Th17-лимфоцитах было значимо выше, чем в группах с недостаточной эффективностью. Получены пороговые значения показателей после индукционного курса ГИБП, ниже которых можно прогнозировать недостаточную эффективность терапии к году лечения: у пациентов с ВЗК для популяции CD39Treg – 34 % от Treg (0,885, 84/81) и популяции CD39Th17 – 15 % от Th17-лимфоцитов (0,765, 68/68); у пациентов с ПС для CD39Treg – 22 % от Treg (0,836, 90/94) и CD39Th17 – 7,3 % от Th17 (0,887, 80/88), у пациентов с РС для популяции CD39Treg – 32,2 % от Treg (0,980, 90/94), для CD39Th17 – 5,6 % от Th17-лимфоцитов (0,925, 80/88), для CD73Th17 – 14,2 % от Th17-лимфоцитов (0,848, 85/75).

#### Уровень цитокинов и цитокиновых комплексов у детей с ИЗЗ в зависимости от стадии заболевания и эффективности лечения ГИБП

Проведённый анализ показал, что при всех обследованных формах патологии пациенты в обострении заболевания имели более высокий уровень большинства изученных ЦК в сравнении с пациентами в ремиссии. Из 25 изученных (панель Th17-лимфоцитов) в обострении заболеваний ЦК были повышены: 23 ЦК при ВЗК, 22 ЦК при ПС. Отличий между состояниями обострения и ремиссии не было: при ВЗК по уровню IL-17A и IL-1β; при ПС – по уровню CCL20/MIP3a, IL-15, IL-1β. При РС в обострении заболевания относительно

ремиссии были повышены 9 ЦК – IL-5, IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-17E/IL25, IL-21, IL-28A, TNF- $\beta$ , GM-CSF. Показано, что наименьший уровень большинства цитокинов как при обострении, так и в ремиссии заболевания наблюдался у пациентов с РС среди обследованных патологий. Были сформированы и проанализированы цитокиновые комплексы (ЦКК) в зависимости от клеток-продуцентов и функциональной направленности цитокинов. Комплексы цитокинов, ассоциированные с клетками, состояли из: комплекс M1 (IL-1+IL-6+TNF- $\alpha$ ), cTh1 (IFN- $\gamma$ +IL12p70+TNF- $\beta$ +IL2), cTh2 (IL-4+IL-5+IL-13+IL-17E/IL-25+IL-33), cTh17 (IL-1 $\beta$ +IL-6+IL-17A+IL-17F+IL-21+IL-22+IL-23). Комплексы, ассоциированные с функциями ЦК состояли из: fTh2+mast (IL-4+IL-5+IL-31+IL-13) fIL12 (IL-12+IL-23+IL-27), fTh17 (IL-17A+IL-17F), fTh2 (IL-4+IL-5+IL-13), fTh22 (IL-13+IL-22).

Проведенный анализ профилей цитокинов, ассоциированных с клетками, показал достоверную разницу между состояниями обострения и ремиссии у пациентов с ВЗК и РС по всем изученным комплексам, а для пациентов с РС – по комплексам cTh1 и M1 (Рисунок 9).



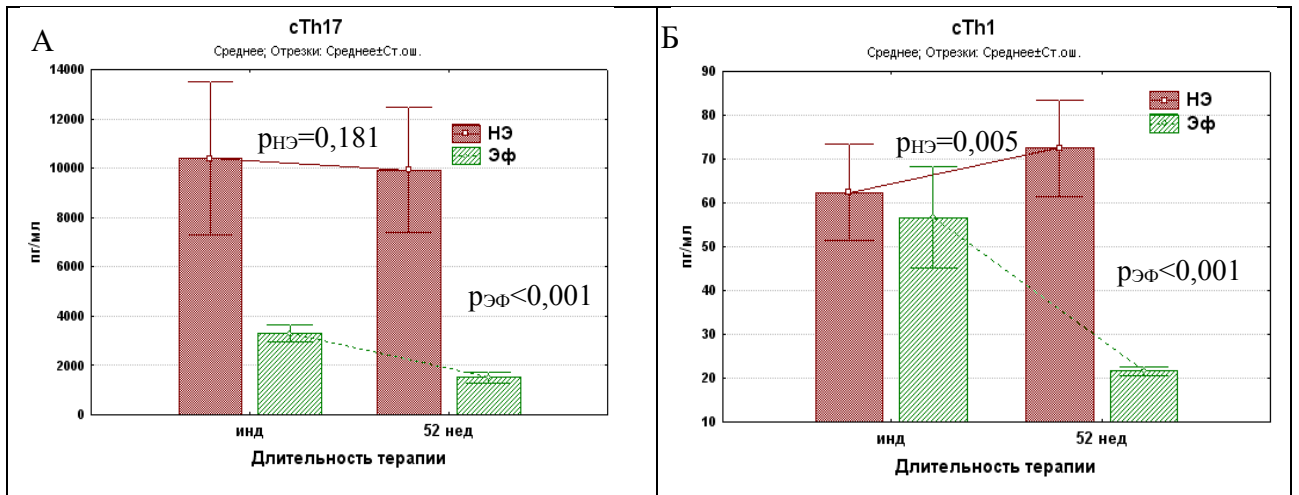
Примечание: \* – достоверные различия между состоянием обострения и ремиссии; по оси ОУ – показаны средние значения по z-score с указанием стандартной ошибки

Рисунок 9 – Z-оценка цитокиновых комплексов (А – cTh1, Б – cTh17), ассоциированных с клетками, при иммунозависимых заболеваниях

Наибольшие значения изученных комплексов выявлены у пациентов с БК, наименьшие у пациентов с РС определены достоверно более низкие значения комплекса cTh17, чем при РС, ЯК и БК как в обострении, так и в ремиссии заболевания (Рисунок 10).

С помощью ROC-анализа получены пороговые значения ЦКК, при превышении которых можно прогнозировать обострение заболевания у пациентов с ИЗЗ на фоне проводимой терапии (cut-off (AUC, Se/Sp %)): при БК – комплекс fTh22 (1340 пг/мл (0,859, 82/83)); при ЯК – комплекс fTh22 (1132 пг/мл (0,830, 82/80), комплекс M1 (20,9 пг/мл (0,924, 85/85)); для РС – комплекс fIL12 (1891 пг/мл (0,932, 80/80)); для РС – комплекс cTh1 (33,1 пг/мл (0,804, 71/72)).

Анализ цитокинов и ЦКК при разной эффективности лечения показал, что в случае эффективного ответа показатели снижаются, а в случае неэффективности значимо не изменяются, либо увеличиваются к году лечения (Рисунок 10).



Примечание:  $p_{Эф}$ ,  $p_{НЭ}$  – достоверность различий между показателями в период индукционного курса и к году терапии в группах пациентов с разной эффективностью ГИБП; cTh17 (IL-1 $\beta$ +IL-6+IL-17A+IL-17F+IL-21+IL-22+IL-23); cTh1 (IFN- $\gamma$ +IL-12p70+TNF- $\beta$ +IL-2);

\* – достоверность различий между группами с разной эффективностью

Рисунок 10 – Динамика уровня цитокиновых комплексов cTh17 (А) при БК и уровня cTh1 (Б) при ПС с разной эффективностью ГИБП

Получено хорошее и очень хорошее качество разделительной модели «эффективность-неэффективность» ( $AUC > 0,8$ ) и установлены пороговые значения. При БК пороговые значения составляли: для IL-17E/IL-25 – 28 пг/мл (0,903, 86/85), IL-23 – 1359 пг/мл (0,909, 93/81), IL-31 – 56 пг/мл (0,906, 86/85), для комплекса cTh17 – 2410 пг/мл (0,911, 86/85), для комплекса fIL12 – 1813 пг/мл (0,912, 89/81). При ЯК пороговые значения для IL-4 составляли 105 пг/мл (0,900, 89/77). При ПС пороговые значения для IL-12p70 составляли 2,7 пг/мл (0,805, 72/73), TNF- $\beta$  – 14,3 пг/мл (0,957, 89/90), IL-31 – 51,3 пг/мл (0,903, 83/90), для комплекса cTh1 – 25,2 пг/мл (0,917, 89/83). При РС пороговые значения для TNF- $\beta$  составляли 5,1 пг/мл (0,893, 86/88), IL-17F – 13,9 пг/мл (0,800, 75/67), IL-27 – 512 пг/мл (0,806, 92/83), для комплекса cTh1 – 29,9 пг/мл (0,875, 79/75). При показателях ЦК и ЦКК, превышающих пороговые значения, можно прогнозировать ускользание эффекта от ГИБП у пациентов с ИЗЗ.

#### Содержание клеток с транслокацией фактора транскрипции NF- $\kappa$ B у детей с иммунозависимыми заболеваниями

Активность NF- $\kappa$ B в группе сравнения и у детей с ИЗЗ независимо от формы и стадии заболевания определяется популяцией лимфоцитов: наибольшее количество клеток с транслокацией NF- $\kappa$ B выявлено в популяции В-лимфоцитов по сравнению с НК-клетками и CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитами ( $p_{CD19\_NK} < 0,001$ ,  $p_{CD19\_CD3} < 0,001$ ), а наименьшее в CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитах ( $p_{NK\_CD3} < 0,001$ ) (Рисунок 11А).

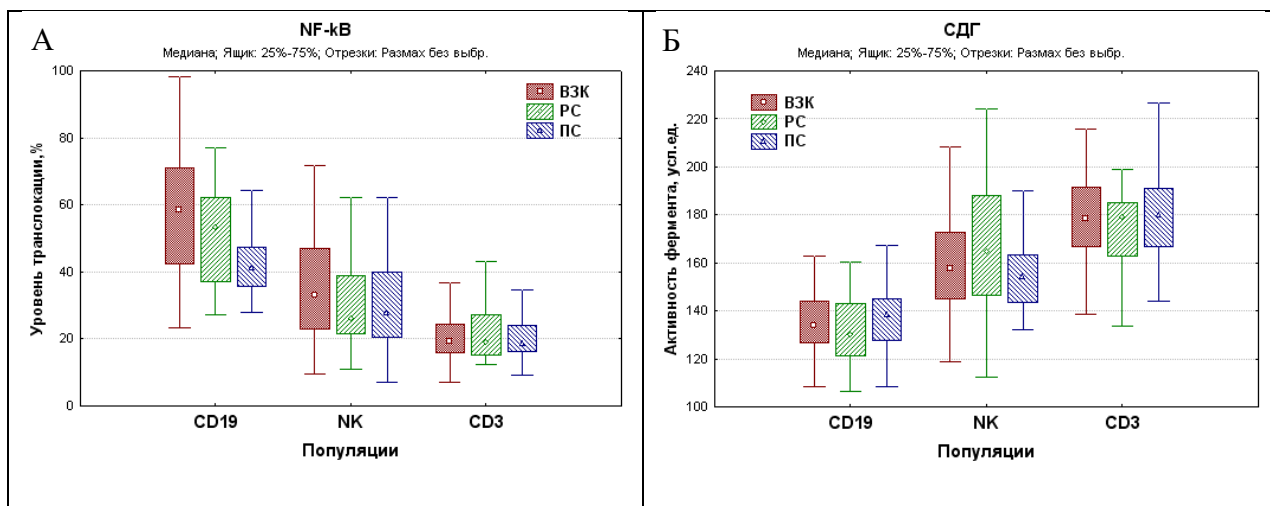
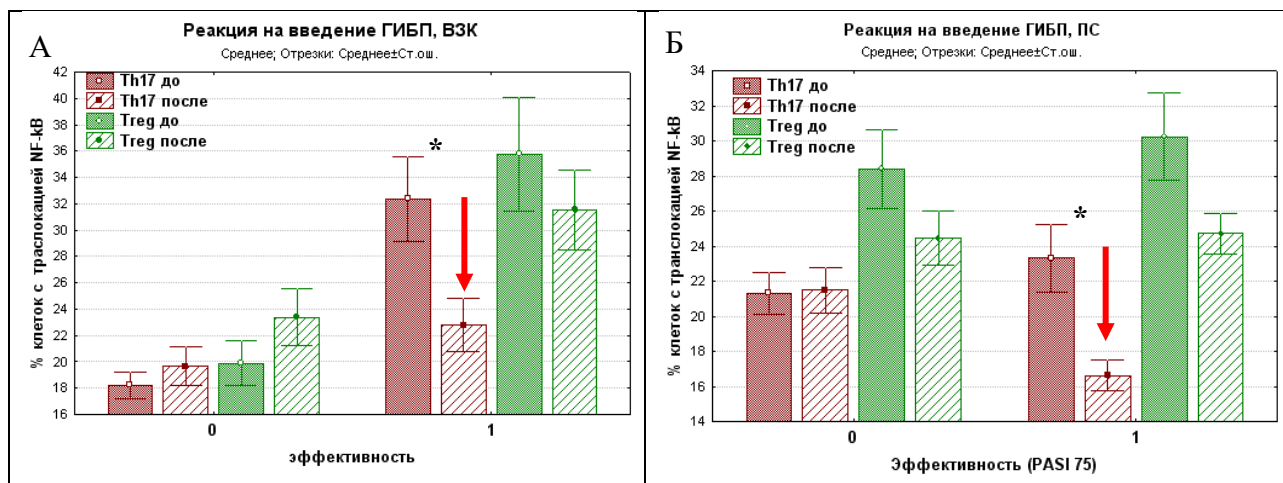


Рисунок 11 – Уровень транслокации NF-κB (А) и активность СДГ(Б) в основных популяциях лимфоцитов у детей с ИЗЗ

Анализ активности митохондриальных ферментов (СДГ, ГФДГ) и NF-κB в популяциях лимфоцитов у пациентов с ИЗЗ выявил отрицательные зависимости, степень которых определялась формой патологии и популяцией клеток. Коэффициенты корреляции между уровнем транслокации NF-κB и активностью СДГ в общей популяции лимфоцитов составили: при ВЗК –  $r = -0,56$  ( $p < 0,001$ ); при ПС –  $r = -0,57$  ( $p < 0,001$ ); при РС –  $r = -0,65$  ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 11Б).

У пациентов выявлены значимо более высокие показатели активности NF-κB при ВЗК в обострении заболевания в популяции NK-клеток в сравнении с пациентами с РС и с ПС, в CD4<sup>+</sup> Т-клетках, Th17-лимфоцитах, цитотоксических Th17-лимфоцитах (Tc17) и Thact в сравнении с пациентами с РС. Проведённый ROC-анализ выявил, что наиболее информативным показателем для разделения состояний обострение/ремиссия является уровень активности NF-κB в популяции NK-клеток (очень хорошее качество разделительной модели –  $AUC > 0,8$ ). Определены пороговые значения по содержанию NK-клеток с транслокацией NF-κB, выше которых можно прогнозировать развитие обострения заболевания у пациентов с ИЗЗ (cut-off (AUC, Se/Sp %)): у пациентов с ВЗК – 36% (0,834, 72/80); у пациентов с ПС – 29% (0,949, 77/96); у пациентов с РС – 27% (0,872, 75/75). У детей с РС также выявлены пороговые значения для цитотоксических Т-лимфоцитов – 25% (0,854, 75/95) и Tc17 – 29% (0,896, 80/95).

Выявлено, что уровень транслокации NF-κB является быстро меняющимся показателем. У пациентов с ВЗК и ПС до введения блокаторов TNF в группе с эффективным лечением выявлено значимо более высокое содержание популяций CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток с транслокацией NF-κB, по сравнению с группой с недостаточно эффективным лечением. При этом, через сутки после введения ГИБП выявлено достоверное снижение содержания клеток с транслокацией NF-κB в Т-, В-, NK-клетках, Th17, Thact, Tc17 клетках у пациентов с ВЗК и ПС в группах с эффективным лечением и отсутствие достоверных изменений в группах с неэффективностью лечения (Рисунок 12).



Примечание: 0 – группа пациентов с недостаточной эффективностью терапии; 1 – группа пациентов с эффективностью терапии; \* – достоверность различий между группами пациентов с  $p < 0,05$

Рисунок 12 – Доля клеток с транслокацией NF-κB в Th17 и Treg лимфоцитах у пациентов с ВЗК с разной эффективностью до и после введения блокаторов TNF

### Оценка остаточного уровня инфликсимаба и адалимумаба и антител к блокаторам TNF у пациентов с болезнью Крона, язвенным колитом и псориазом

У детей с БК и ЯК при лечении IFX (249 тестов) и ADA (321 тестов), у пациентов с ПС при лечении ADA (82 теста) проведена оценка остаточного уровня блокаторов TNF и антител к ним в период поддерживающего курса.

Сравнение определения остаточного уровня блокаторов TNF (адалимумаб, инфликсимаб) в сыворотках пациентов с ВЗК с помощью двух методов ИФА (96-луночный формат) и экспресс-тестом выявило высокую достоверную корреляцию между показателями для IFX –  $r=0,96$  и для ADA –  $r=0,86$ . После согласования с локальным этическим комитетом, экспресс-тест по определению остаточного уровня блокаторов TNF был внедрён в клиническую практику Центра воспалительных заболеваний кишечника у детей ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», что существенно ускорило получение результатов и позволило проводить своевременную коррекцию дозы и кратности ГИБП.

Выявлено, что у детей с ВЗК во время поддерживающего курса ГИБП концентрация остаточного уровня IFX (3,1 [1,1-5,8] мкг/мл) и ADA (13,3 [10,3-15,7] мкг/мл) в сыворотках крови в состоянии клинической ремиссии достоверно выше, чем у детей в состоянии клинического обострения заболевания IFX (0,7 [0,36-2,54] мкг/мл), ADA (5,9 [3,4-9,7] мкг/мл). У 28% пациентов с ВЗК были обнаружены антилекарственные антитела (АЛА) к IFX в обострении (в 27,3% случаев) и в ремиссии заболевания (в 5,8% случаев). Остаточный уровень IFX у пациентов с наличием АЛА в состоянии ремиссии был выше 7 мкг/мл, а в группе детей в состоянии обострения был ниже терапевтического уровня и составлял от 0,12 до 2,04 мкг/мл. Антилекарственные антитела у детей с ВЗК при лечении ADA были обнаружены в 12,5% случаев только у пациентов в обострении заболевания с низким остаточным уровнем препарата от 2,12 до 3,02 мкг/мл.

Применение комбинированной терапии – IFX с азатиоприном (AZA) у пациентов с БК и комбинированной терапии – ADA с азатиоприном у пациентов с БК и ЯК не влияло на остаточный уровень блокаторов TNF. Анализ показал, что у пациентов с ЯК, получавших

комбинированную терапию IFX с азатиоприном, концентрация остаточного уровня препарата была достоверно выше, чем в группе с монотерапией IFX (2,2 [0,65-5,7] мкг/мл против 0,4 [0,27-3,55] мкг/мл соответственно,  $p=0,005$ ). Кроме того, у пациентов с ЯК при применении комбинированной терапии (IFX и AZA) АЛА к IFX выявлялись в 11% случаев, а в группе пациентов только при лечении IFX в 67% случаев.

Пороговые значения остаточного уровня IFX, выше которых можно прогнозировать клиническую ремиссию составили (cut-off, мкг/мл (AUC, Se/Sp %)): у пациентов с БК – 4,9 (0,812, 54/ 83), у пациентов с ЯК – 4,5 (0,851, 65/ 86). Установлено, что пациентам с ЯК при лечении ADA для достижения клинической ремиссии требуются значимо более высокие уровни, чем пациентам с БК. У пациентов с БК и ЯК для достижения эндоскопической ремиссии остаточный уровень ADA значимо выше, чем для клинической ремиссии. Детям с массой тела <40 кг для достижения клинической и эндоскопической ремиссии необходимы более высокие уровни остаточного уровня ADA, чем пациентам с массой тела >40 кг.

Определены пороговые значения для остаточного уровня ADA у пациентов с БК, выше которых можно прогнозировать достижение ремиссии заболевания: для клинической ремиссии  $\geq 40$  кг – 8,1 мкг/мл (0,890, 100/76); для клинической ремиссии <40 кг – 13,1 (0,890, 86/75); для эндоскопической ремиссии  $\geq 40$  кг – 10,5 (0,871,100/67); для эндоскопической ремиссии <40 кг – 14,2 мкг/мл (0,871, 75/71). Пороговые значения остаточного уровня ADA у пациентов с ЯК составили: пациенты с клинической ремиссией  $\geq 40$  кг – 11,1 мкг/мл (0,845, 75/71); пациенты с клинической ремиссией <40 кг – 11,8 мкг/мл (0,845, 86/80); пациенты с эндоскопической ремиссией  $\geq 40$  кг – 11,9 мкг/мл (0,821, 83/69); пациенты с эндоскопической ремиссией <40 кг – 13,1 мкг/мл (0,821, 100/100).

Коррекция терапии в результате проактивного (непосредственно перед следующим введением препарата) терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) проведена у 54% пациентов на IFX и у 46% на ADA. В 55 % случаев у пациентов при лечении IFX и 59% случаев на ADA причиной коррекции был недостаточный уровень блокаторов TNF (без наличия антилекарственных антител). Увеличение дозы препарата, сокращение интервала введения приводило к положительному эффекту в большинстве случаев. Смена препарата в результате проактивного ТЛМ потребовалась у пациентов в 28 % случаев при лечении IFX и 30 % случаев при лечении ADA, а в результате реактивного (при обострении заболевания) ТЛМ – в 75% случаев при лечении IFX и 78% случаев при лечении ADA. В большинстве случаев (при недостаточном/высоком уровне) увеличение/уменьшение дозы, сужение или расширение интервалов введения препарата позволило достичь ремиссии у пациентов: у 72 % при лечении IFX, у 63 % пациентов при лечении ADA. Анализ эффективности терапии у пациентов без ТЛМ показал, что достижение ремиссии к году терапии при лечении IFX было достигнуто только в 21% случаев, а при лечении ADA – в 37% случаев.

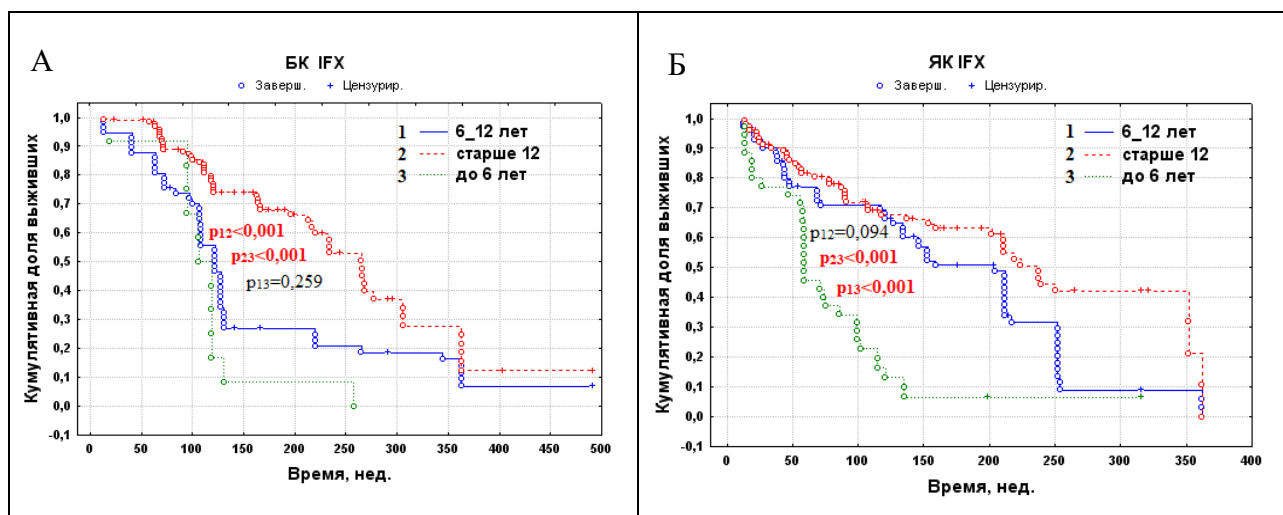
Анализ остаточного уровня в группах пациентов с недостижением PASI 75 (группа 1,  $n=23$ ) и с достижением PASI 75 (группа 2,  $n=16$ ) выявил достоверно большие значения остаточного уровня ADA в группе 2 (группа 1 – 13,2 [5,1-16,3] мкг/мл, группа 2 – 18,2 [1,24-20,6] мкг/мл,  $p=0,015$ ).

### Влияние клиничко-анамнестических факторов и иммунологических показателей на выживаемость биологической терапии у пациентов с ИЗЗ

Выживаемость биологической терапии (ВБТ) – это отрезок времени от момента инициации генно-инженерной биологической терапии до момента её прекращения по каким-либо причинам.

Исследование кривых выживаемости Каплана-Майера проведено у 383 пациентов с ИЗЗ (БК – 117, ЯК – 83, ПС – 87, РС – 96). Выявлено, что ВБТ для блокаторов TNF при ВЗК зависит от формы патологии: показатель ВБТ при лечении IFX у пациентов с БК составил ( $M \pm m$ )  $161,0 \pm 7,4$  недель, у пациентов с ЯК –  $135,0 \pm 6,7$  недель,  $p=0,004$ ; показатель ВБТ при лечении ADA у пациентов с БК –  $134,0 \pm 4,5$  недель, ЯК –  $117,7 \pm 9,1$  недель,  $p < 0,001$ .

Сравнительный анализ у детей с ВЗК показал влияние возраста на показатель ВБТ как при БК, так и при ЯК. Наибольший показатель ВБТ выявлен у пациентов с БК при лечении IFX в возрастной группе старше 12 лет ( $169,1 \pm 8,7$  недель), а наименьший – у пациентов с БК младше 6 лет ( $115,1 \pm 15,4$ ),  $p < 0,001$ . У пациентов с ЯК при лечении IFX показатели ВБТ в группах старше 12 лет ( $142,9 \pm 10$ ) и 6-12 лет ( $152,1 \pm 11,2$ ) не отличались, но были значимо выше, чем в группе детей младше 6 лет – ( $77,6 \pm 10$ ),  $p < 0,001$  (Рисунок 13).



Примечание:  $p$  – достоверность различий между кривыми по критерию Гехана-Вилкоксона

Рисунок 13 - Кривые выживаемости Каплана- Майера у детей с БК (А) и ЯК (Б) при терапии IFX в разных возрастных группах

При сравнении показателей ВБТ в зависимости от применяемого блокатора TNF у детей с БК старше 12 лет получено, что наибольший показатель выживаемости определялся при лечении IFX по сравнению с ADA ( $158,7 \pm 7$  против  $123,2 \pm 7,1$  соответственно  $p < 0,001$ ). Установлено, что у пациентов с ВЗК при лечении ADA (2-й препарат) с предшествующей терапией IFX (1-й препарат) выживаемость была выше ( $127,6 \pm 12,2$  недель), чем у пациентов где ADA 1-ый препарат ( $76,4 \pm 9,9$  недель,  $p < 0,001$ ).

Показано, что показатель ВБТ зависит от применения дополнительных иммунодепрессантов. Показатель ВБТ при комбинированной терапии IFX/ADA с азатиоприном при ВЗК и ADA с метотрексатом при ПС больше, чем у пациентов только на монотерапии ГИБП: IFX с AZA –  $70,5 \pm 2,8$  недель, без AZA –  $48,7 \pm 5,4$  недель,  $p=0,003$ ; ADA с AZA –  $65,4 \pm 4,3$  недель, без AZA –  $56,1 \pm 4,7$  недель,  $p=0,044$ ; ADA с метотрексатом –  $91,9 \pm 9,1$

недель, без метотрексата –  $81,4 \pm 12,8$  недель,  $p=0,034$ . Отмечено, что различия в кривых выживаемости сохранялись при длительности приёма дополнительных иммунодепрессантов не более 2-х лет при ВЗК и не более 3-х лет при РС.

Выявлено, что у пациентов с ИЗЗ при повышенном иммунологическом индексе Th17/Treg показатель ВБТ ГИБП был ниже, чем при индексе в пределах возрастного референсного диапазона и составил: в группе ВЗК IFX –  $103,8 \pm 15,5$  недель против  $159,3 \pm 4,6$  недель,  $p=0,005$ ; ВЗК ADA –  $108,9 \pm 8,7$  недель против  $145,7 \pm 8,5$  недель,  $p=0,002$ ; РС –  $106,9 \pm 10,3$  недель против  $168,4 \pm 7,4$  недель,  $p<0,001$ ; РС –  $113 \pm 9,5$  недель против  $159,3 \pm 14,7$ ,  $p<0,001$  (Рисунок 14А). Оценка кривых выживаемости ГИБП в зависимости от активности СДГ в регуляторных Т-клетках показала более низкие значения ВБТ при снижении активности СДГ в Treg  $<182$  усл.ед. относительно активности СДГ  $\geq 182$  усл.ед.: в группе ВЗК IFX –  $107,7 \pm 12,1$  недель против  $158,0 \pm 14,1$  недель,  $p=0,003$ ; ВЗК ADA –  $120,1 \pm 8,2$  недель против  $146,7 \pm 9,9$  недель,  $p=0,002$ ; РС –  $145,21 \pm 8,2$  недель против  $162,5 \pm 11,2$  недель,  $p=0,029$ ; РС –  $107,7 \pm 12,1$  недель против  $158,0 \pm 14,1$  недель,  $p=0,003$  (Рисунок 14Б).

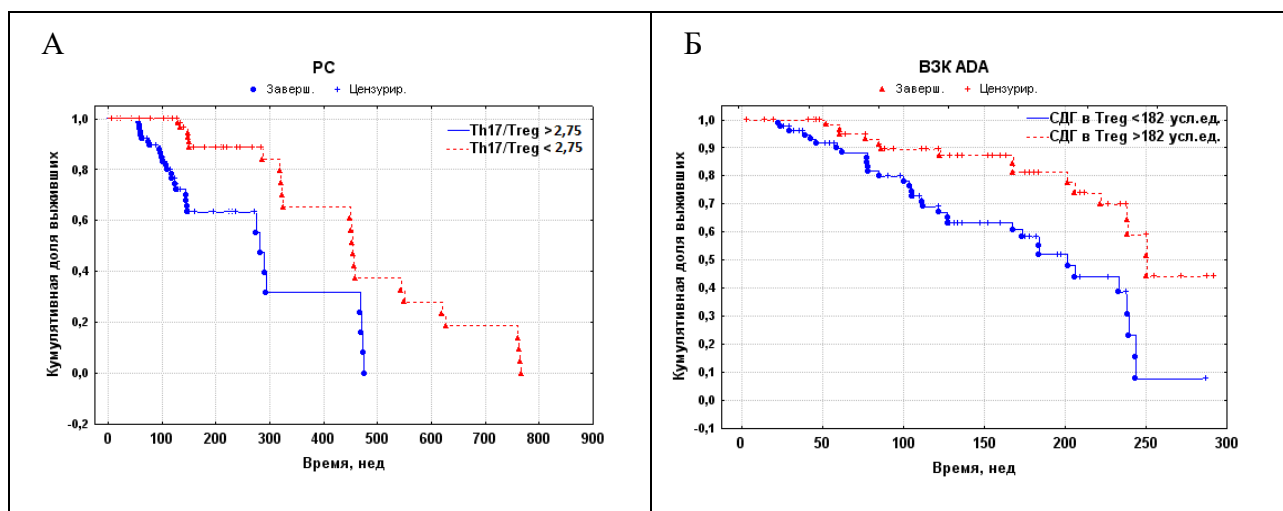


Рисунок 14 – Кривые выживаемости Каплана – Майера у пациентов с рассеянным склерозом в зависимости от индекса Th17/Treg (А) и у пациентов с ВЗК в зависимости от активности СДГ в Treg (Б)

### Проверка прогностической значимости иммунологических маркеров при лечении биологическими препаратами у детей с ИЗЗ

Для иммунологических маркеров, продемонстрировавших хорошее качество разделительной модели «эффективность-неэффективность» ( $AUC > 0,8$ ), проведена оценка совпадения прогноза и реальных событий. Проверка проведена на 2-х внутренних выборках – каждый 3-ий пациент с известным эффектом терапии к году (ВЗК – 744 наблюдения, РС – 89 наблюдений) и 1-ой внешней выборке (37 пациентов с РС старше 12 лет в динамике терапии (97 наблюдений) устекинумабом – анти IL-12/23). Были отобраны иммунологические маркеры, показавшие вероятность правильного прогноза терапии не менее 70%. Высокая вероятность прогноза недостаточного эффекта от терапии ГИБП у пациентов с ИЗЗ выявлена для следующих маркеров: соотношения Th17/Treg и абсолютного содержания Treg во все периоды лечения при всех ИЗЗ; активности СДГ в Treg – при ВЗК; сочетании активности СДГ в Treg и возрастных значений индекса Th17/Treg – при ВЗК и РС; субпопуляций Т-клеток

памяти – при всех ИЗЗ; относительного содержания Treg и Th17 с экспрессией энтонуклеотидаз CD39/CD73 после индукционного курса – при ВЗК и РС. Повышение превышение относительного содержания NK-клеток с транслокацией NF-κB выше пороговых значений прогнозирует активацию воспалительного процесса на фоне терапии при всех изученных ИЗЗ.

#### **Алгоритм иммунологического обследования пациентов с ВЗК, ПС и РС**

Разработан алгоритм иммунологического обследования для оценки эффективности применения ГИБП у пациентов с ИЗЗ, включающий минимальный набор наиболее информативных тестов, которые показали высокую вероятность прогноза на основных и проверочных выборках пациентов (Рисунок 15).

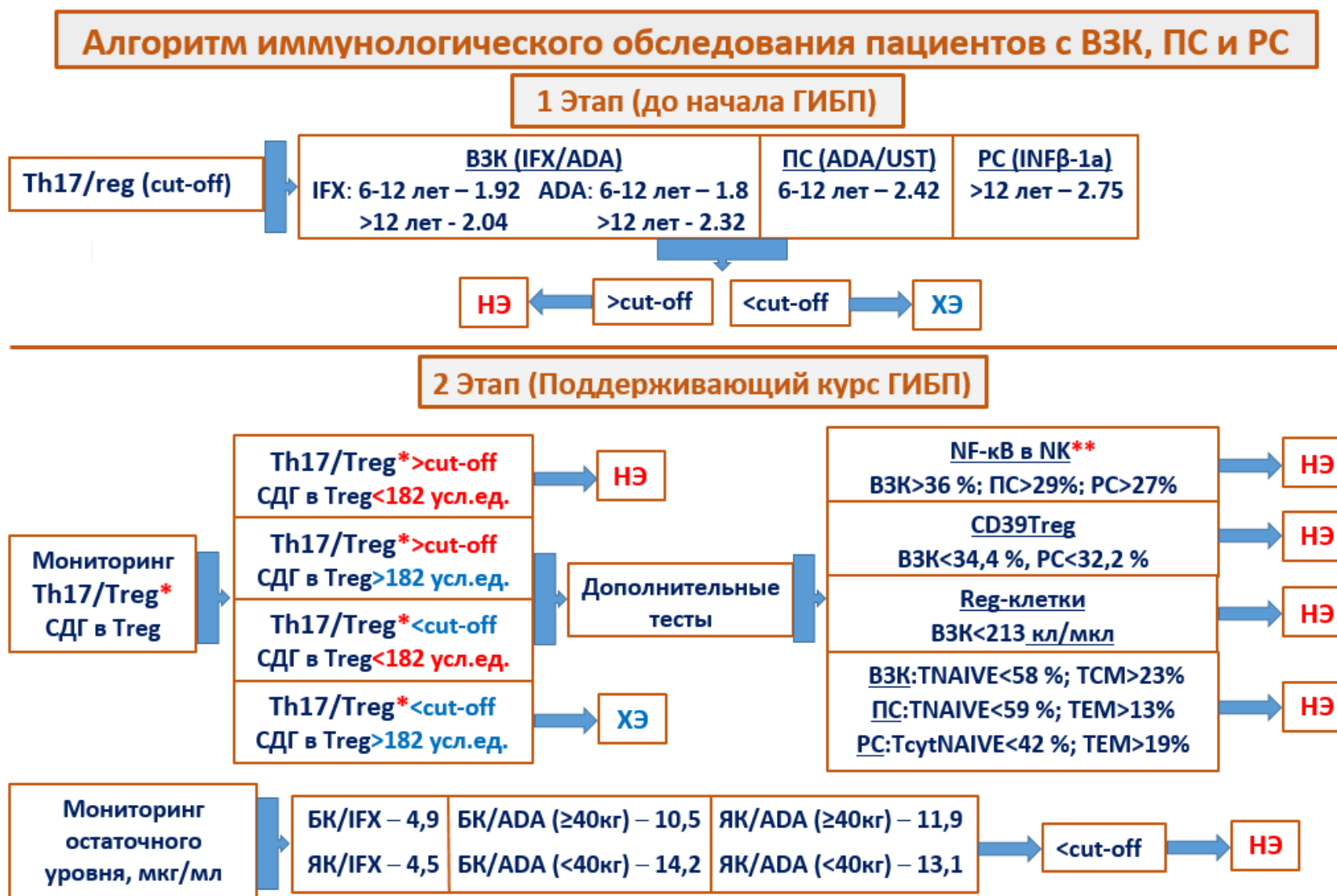
До начала терапии ГИБП всем пациентам с ИЗЗ (ВЗК, ПС, РС) необходимо проведение иммунофенотипирования лимфоцитов с определением индекса Th17/Treg методом проточной цитометрии. Превышение возрастных пороговых значений индекса Th17/Treg прогнозирует риск неэффективности терапии.

Во время поддерживающего курса ГИБП всем пациентам с ИЗЗ при плановой госпитализации показано проведение иммуноцитохимического исследования, включающего оценку индекса Th17/Treg и активности СДГ в Treg:

- при получении показателей, превышающих возрастные пороговые значения для соотношения Th17/Treg и активности СДГ в Treg ниже 182 усл. ед., можно прогнозировать неэффективность ГИБП;
- при получении показателей, не превышающих возрастные пороговые значения для соотношения Th17/Treg и активности СДГ в Treg  $\geq 182$  усл. ед., можно прогнозировать эффективность ГИБП;
- при получении сомнительных результатов (Th17/Treg > пороговых значений при СДГ в Treg  $\geq 182$  усл. ед., Th17/Treg < пороговых значений при СДГ в Treg < 182 усл. ед.) необходимо проведение одного из дополнительных тестов, которые могут подтвердить риск неэффективности терапии: при ВЗК – NF-κB в NK-клетках >36%, CD39Treg < 34,4%, MDSCs+Treg < 213 кл/мкл, TNAIVE < 58% CD4, TCM  $\geq 23\%$  CD4; при ПС – NF-κB в NK-клетках >29%, TEM  $\geq 13\%$  CD4; при РС – NF-κB в NK-клетках >27%, CD39Treg < 32,2%, TEM  $\geq 19\%$  CD4 и TcytNAIVE < 42% CD4.

После индукционного курса блокаторов TNF пациентам с ВЗК рекомендовано проведение проактивного терапевтического лекарственного мониторинга остаточного уровня ГИБП и антилекарственных антител в сыворотке крови непосредственно перед следующим введением препарата, а также реактивного ТЛМ остаточного уровня препаратов при клиническом и эндоскопическом обострении. Снижение остаточного уровня ниже пороговых значений с наличием или без АЛА требует коррекции терапии (изменения дозы препарата, назначения дополнительной иммуносупрессии, смены препарата).

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить иммунологические критерии прогноза эффективности биологической терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника, псориазом и рассеянным склерозом.



Примечание: \* – возрастные пороговые значения Th17/Treg для каждой патологии; \*\* – уровень транслокации NF-κB в НК отражает эффективность терапии, а также активность воспалительного процесса в данный момент.

Рисунок 15 – Алгоритм иммунологического обследования пациентов с ИЗЗ для оценки эффективности терапии ГИБП

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование представляет собой оценку широкого спектра иммунологических маркеров у детей с воспалительными заболеваниями кишечника, псориазом и рассеянным склерозом, получающих биологическую терапию. Анализируемые показатели включали: количественную характеристику субпопуляций Т-, В- и НК-клеток, активированных Т-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток (Treg), Th17-лимфоцитов; оценку содержания миелоидных супрессорных клеток (MDSCs) с определением активности аргиназы-1; определение содержания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти; анализ малых субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73; активность митохондриальных дегидрогеназ (СДГ, ГФДГ) и фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов; определение уровня циркулирующих цитокинов и их комплексов; количественное определение остаточных концентраций блокаторов фактора некроза опухоли (инфликсимаба и адалимумаба), а также антител к данным препаратам в сыворотке крови.

Выявлены информативные критерии прогноза эффективности биологической терапии на разных этапах лечения, включающие соотношение Th17/Treg, содержание MDSCs, регуляторных клеток (Treg и MDSCs), популяций Т-клеток памяти. Мониторинг содержания НК-клеток с транслокацией NF-κB отражает динамику активности воспалительного процесса.

Независимо от формы патологии определение метаболической активности клеток (экспрессии эктонуклеотидаз в популяциях Treg/Th17, активности аргиназы-1 в MDSCs и активности СДГ в Treg) является значимым для оценки стадии заболевания и прогноза эффективности ГИБП. Сформированы цитокиновые комплексы, отражающие активность патологического процесса в зависимости от формы патологии и ответа на терапию.

Обоснована необходимость использования терапевтического лекарственного мониторинга остаточного уровня блокаторов TNF и антител к ним для оптимизации лечения у пациентов с ВЗК. Получены пороговые значения остаточного уровня инфликсимаба и адалимумаба, позволяющие прогнозировать обострение патологического процесса и эффективность биологической терапии.

Выявлена зависимость выживаемости биологической терапии у детей с ВЗК, псориазом и рассеянным склерозом от иммунологических показателей (соотношение Th17- лимфоцитов к Treg, активность СДГ в Treg).

Разработан алгоритм иммунологического обследования пациентов, позволяющий оценить риск неэффективности биологической терапии до её назначения и на этапе поддерживающего курса.

## ВЫВОДЫ

1. Таргетная терапия (ингибиторами фактора некроза опухоли и интерфероном бета-1α) при различных формах иммунозависимых заболеваний у детей вызывает типовую реакцию лимфоцитов: значимое увеличение CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и снижение НК-клеток к году лечения независимо от клинического ответа. Эффективность лечения определяется уменьшением или нормализацией уровней провоспалительных Th17-лимфоцитов. Стойкое увеличение этой популяции лимфоцитов является общим признаком недостаточности

лечения. Динамика регуляторных Т-клеток зависит от формы иммуноопосредованной патологии у детей: при воспалительных заболеваниях кишечника и рассеянном склерозе их уровень находится в пределах референсного интервала вне зависимости от эффекта лечения, при псориазе – сопровождается значимым уменьшением числа регуляторных Т-лимфоцитов.

2. Иммунологический индекс Th17/Treg является значимым критерием эффективности лечения генно-инженерными биологическими препаратами иммунозависимых заболеваний у детей и определяется пороговыми значениями индекса ( $AUC > 0,8$ ) для различных форм иммунозависимой патологии, возрастных групп больных и биологических препаратов, при этом существенное превышение индекса ассоциируется с неэффективностью лечения.

3. Обострение течения иммунозависимых заболеваний у детей сопровождается функциональной несостоятельностью клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSCs), связанной с увеличением их относительного содержания при снижении активности аргиназы-1. Суммарное уменьшение абсолютного числа клеток-супрессоров миелоидного происхождения и регуляторных Т-лимфоцитов ниже пороговых значений до начала биологической терапии является значимым показателем неэффективности лечения генно-инженерными биологическими препаратами иммунозависимых заболеваний у детей к году лечения:  $< 213$  кл/мкл у больных с воспалительными заболеваниями кишечника,  $< 145$  кл/мкл у больных псориазом,  $< 117$  кл/мкл – у больных рассеянным склерозом.

4. Увеличение активности течения иммунозависимых заболеваний у детей сопровождается уменьшением доли наивных Т-клеток памяти и увеличением доли эффекторных  $CD8^+$  Т-клеток памяти при рассеянном склерозе, а также центральных  $CD4^+$  Т-клеток памяти при воспалительных заболеваниях кишечника и псориазе. Недостаточную эффективность лечения после индукционного курса генно-инженерными биологическими препаратами иммунозависимых заболеваний у детей к году терапии определяют следующие пороговые значения доли субпопуляций  $CD4^+$ Т-лимфоцитов: у больных с воспалительными заболеваниями кишечника – наивных  $CD4^+$  Т-клеток меньше 58%, наивных цитотоксических Т-лимфоцитов меньше 53%, центральных  $CD4^+$  Т-клеток памяти больше 23%, терминально-дифференцированных эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов больше 17%; у больных псориазом – наивных  $CD4^+$  Т-клеток меньше 59%, центральных  $CD4^+$  Т-клеток памяти больше 22%, эффекторных  $CD4^+$  Т-клеток памяти больше 13%; у больных рассеянным склерозом – наивных цитотоксических Т-лимфоцитов меньше 42%, эффекторных  $CD4^+$  Т-клеток памяти больше 20%, терминально-дифференцированных эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов больше 22%.

5. Предиктором недостаточной эффективности лечения генно-инженерными биологическими препаратами иммунозависимых заболеваний у детей является исходно низкая активность сукцинатдегидрогеназы в регуляторных Т-лимфоцитах. Прогнозирование недостаточной эффективности лечения определяется пороговыми значениями активности сукцинатдегидрогеназы: при лечении инфликсимабом  $< 185$  усл.ед. и адалимумабом  $< 186$  усл.ед. воспалительных заболеваний кишечника; при лечении псориаза адалимумабом  $< 193$  усл.ед.; при терапии рассеянного склероза интерфероном бета-1а  $< 187$  усл.ед.

Дополнительным показателем при лечении рассеянного склероза интерфероном бета-1 $\alpha$  является уменьшение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в НК-клетках <173 усл.ед. и в регуляторных Т-лимфоцитах <168 усл.ед.

6. При прогрессировании течения иммунозависимых заболеваний у детей увеличивается содержание глюкозо-6-фосфат изомеразы на 18%, гипоксией-индуцируемого фактора 1 альфа (HIF-1 $\alpha$ ) на 50%, транскетолазы на 29% при уменьшении уровней M2 изоформы пируваткиназы на 68% и белков I-III комплексов окислительного фосфорилирования (НАД\*Н-убихинон оксидоредуктазы на 28%, сукцинат убихинон оксидоредуктазы на 56%, убихинон цитохром С оксидоредуктазы на 49%) в лимфоцитах периферической крови, что свидетельствует об интенсификации гликолиза на фоне снижения окислительного фосфорилирования при активации течения указанных форм патологии у детей.

7. При иммунозависимых заболеваниях у детей содержание лимфоцитов с экспрессией поверхностных эктонуклеотидаз CD39 и CD73, ответственных за катаболизм внеклеточного АТФ в аденозин, определяется популяцией CD4<sup>+</sup> Т-клеток: максимальная доля клеток, экспрессирующих CD39, выявлена в пуле регуляторных Т-лимфоцитов; фермент CD73 представлен преимущественно на активированных Т-хелперах. Активная фаза болезни Крона и рассеянного склероза характеризуется значимым уменьшением доли CD39<sup>+</sup> в регуляторных Т-лимфоцитах и в Th17-лимфоцитах (при воспалительных заболеваниях кишечника, псориазе и рассеянном склерозе), АТФ-азная активность фермента CD39 обратно зависит от количества CD39<sup>+</sup> регуляторных Т-лимфоцитов. Для мониторинга ответа на биологическую терапию после индукционного курса установлены пороговые значения доли CD39<sup>+</sup> в регуляторных Т-лимфоцитах, уменьшение которых предсказывает утрату эффективности лечения у детей: при воспалительных заболеваниях кишечника <34%, при псориазе <22%, при рассеянном склерозе <32%.

8. Содержание цитокинов и цитокиновых комплексов специфично для изученных форм иммунозависимых заболеваний у детей и имеет пороговые значения (AUC>0,8), превышение которых позволяет прогнозировать обострение заболевания на фоне биологической терапии: при болезни Крона – комплекс fTh22 (1340 пг/мл); при язвенном колите – комплексы fTh22 (1132 пг/мл) и M1 (21 пг/мл); при псориазе – комплекс fIL12 (1891 пг/мл); при рассеянном склерозе – комплекс cTh1 (33 пг/мл). При поддерживающей биологической терапии иммунозависимых заболеваний у детей повышенные концентрации цитокинов и цитокиновых комплексов являются показателями недостаточного клинического ответа. Для изученных форм патологии определены пороговые концентрации, превышение которых указывает на низкую эффективность лечения: при болезни Крона – IL-17E/IL-25 (28 пг/мл), IL-23 (1359 пг/мл), IL-31 (56 пг/мл), cTh17 (2410 пг/мл), fIL12 (1813 пг/мл); при язвенном колите – IL4 (105 пг/мл); при псориазе – IL12p70 (2,7 пг/мл); TNF $\beta$  (14,3 пг/мл), IL-31 (51,3 пг/мл), cTh1(25,2 пг/мл); при рассеянном склерозе – TNF $\beta$  (5,1 пг/мл), IL-17F (13,9 пг/мл), IL-27 (512 пг/мл), cTh1 (29,9 пг/мл).

9. Активность фактора транскрипции  $\kappa\text{B}$  у больных иммунозависимыми заболеваниями существенно зависит от популяции клеток: наибольшее число клеток с транслокацией NF- $\kappa\text{B}$  выявлено в популяции В-лимфоцитов по сравнению с НК-клетками и Т-лимфоцитами ( $p_{\text{CD19\_NK}} < 0,001$ ,  $p_{\text{CD19\_CD3}} < 0,001$ ), а наименьшее – в Т-лимфоцитах ( $p_{\text{NK\_CD3}} < 0,001$ ). Увеличение активности NF- $\kappa\text{B}$  при обострении течения воспалительных заболеваний кишечника и псориаза определяется во всех изученных популяциях лимфоцитов, кроме В-лимфоцитов; у больных рассеянным склерозом – в  $\text{CD4}^+$ - и  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитах, Treg и Tc17 клетках. При этом выявлены значимые обратные корреляции между числом клеток с транслокацией NF- $\kappa\text{B}$  и активностью сукцинатдегидрогеназы в общей популяции лимфоцитов (при воспалительных заболеваниях кишечника  $r = -0,56$ , при псориазе  $r = -0,57$ , при рассеянном склерозе  $r = -0,65$ ;  $p < 0,001$ ). Количество клеток с транслокацией NF- $\kappa\text{B}$  в популяции НК-лимфоцитов является объективным маркером текущей воспалительной активности и позволяет прогнозировать утрату ответа на биологическую терапию при превышении пороговых значений ( $>36\%$  при воспалительных заболеваниях кишечника,  $>29\%$  при псориазе,  $>27\%$  при рассеянном склерозе).

10. Остаточные концентрации блокаторов TNF в сыворотке крови детей с воспалительными заболеваниями кишечника и псориазом в состоянии клинической ремиссии увеличены по сравнению с их уровнями при обострении заболевания: у больных с воспалительными заболеваниями кишечника при лечении инфликсимабом (IFX) – 3,1(1,1-5,8) мкг/мл против 0,7 (0,4-2,5) мкг/мл ( $p=0,002$ ); у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника при терапии адалимумабом (ADA) – 13,3(10,3-15,7) мкг/мл против 5,9 (3,4-9,7) мкг/мл ( $p=0,001$ ); у больных псориазом при лечении ADA – 18,2 (1,2-20,6) мкг/мл против 13,2 (5,1-16,3) мкг/мл ( $p=0,015$ ). При использовании адалимумаба для достижения клинической ремиссии у больных язвенным колитом требуются более высокие дозы препарата, чем у пациентов с болезнью Крона. Пациентам с воспалительными заболеваниями кишечника для достижения эндоскопической ремиссии необходимы более высокие дозы препаратов, чем для достижения клинической ремиссии. Детям с массой тела менее 40 кг для достижения клинической и эндоскопической ремиссии необходим более высокий остаточный уровень ADA, чем больным с массой тела более 40 кг.

11. Антiteleкарственные антитела к генно-инженерным биологическим препаратам выявлены у 28% детей с воспалительными заболеваниями кишечника при лечении инфликсимабом, у 13% больных с воспалительными заболеваниями кишечника при терапии ADA и у 3% больных псориазом при лечении адалимумабом обострения заболевания во время поддерживающего курса терапии. При воспалительных заболеваниях кишечника у детей наличие антiteleкарственных антител к блокаторам TNF при остаточных уровнях выше 7 мкг/мл не влияет на достижение ремиссии на фоне генно-инженерной биологической терапии. Проактивный лекарственный мониторинг показал, что у детей с воспалительными заболеваниями кишечника коррекция терапии потребовалась в 54% случаев при лечении инфликсимабом и в 30% случаев при терапии адалимумабом. Реактивный лекарственный мониторинг выявил необходимость коррекции биологической терапии в 100% случаев при

лечении IFX и ADA. Изменения дозы и интервалов введения препаратов на основании данных лекарственного мониторинга позволили достичь ремиссии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника в 72% случаев при лечении инфликсимабом и в 63% случаев при терапии адалимумабом против 21% случаев при терапии IFX и 30% случаев при лечении ADA без применения терапевтического лекарственного мониторинга, что определяет необходимость его использования для улучшения эффективности генно-инженерной биологической терапии.

12. Выживаемость биологической терапии (БТ) у детей с иммунозависимыми заболеваниями зависит: от формы патологии (у пациентов с болезнью Крона при лечении инфликсимабом она составила  $161 \pm 7$  недель, у больных язвенным колитом –  $135 \pm 7$  недель,  $p=0,004$ ); от возраста больных (выживаемость у больных язвенным колитом младше 6 лет при лечении инфликсимабом составила  $78 \pm 10$  недель, у детей старше 12 лет –  $143 \pm 10$  недель,  $p=0,001$ ); от применяемого биологического препарата (выживаемость БТ у детей с болезнью Крона старше 12 лет при лечении инфликсимабом на 36 недель больше, чем при терапии адалимумабом,  $p<0,001$ ); от предшествующей биологической терапии (выживаемость БТ у детей с воспалительными заболеваниями кишечника при лечении адалимумабом с предшествующей терапией инфликсимабом больше на 51 неделю, чем при монотерапии адалимумабом,  $p<0,001$ ); от применения дополнительных иммунодепрессантов (выживаемость БТ у детей с воспалительными заболеваниями кишечника при лечении IFX/ADA в комбинации с азатиоприном и у больных псориазом при терапии ADA с метотрексатом выше, чем у детей при монотерапии генно-инженерными биологическими препаратами,  $p<0,05$ ); от значений иммунологического индекса Th17/Treg (увеличение индекса относительно возрастного референсного диапазона сопровождается уменьшением выживаемости БТ,  $p<0,05$ ); от изменений активности СДГ в Treg лимфоцитах (при активности СДГ в Treg  $<182$  усл.ед выживаемость БТ меньше на 50 недель у детей с воспалительными заболеваниями кишечника при лечении инфликсимабом и на 27 недель при терапии адалимумабом, на 18 недель у больных псориазом при лечении адалимумабом, на 70 недель при лечении больных рассеянным склерозом при терапии  $INF\beta-1a$ ,  $p<0,05$ ).

13. При иммунозависимых заболеваниях разработан оригинальный двухэтапный алгоритм иммунологического обследования детей (I этап – до начала терапии, II этап – после индукционного курса и во время поддерживающего курса), который обеспечивает не менее 70% совпадений с правильным прогнозом эффективности биологической терапии. Основными критериями прогнозирования являются значения иммунологического индекса Th17/Treg и активности СДГ в регуляторных Т-лимфоцитах (I и II этап) у больных. Дополнительными критериями прогнозирования эффективности биологической терапии у детей при воспалительных заболеваниях кишечника, псориазе и рассеянном склерозе (II этап) являются относительное содержание регуляторных Т-лимфоцитов с экспрессией CD39, абсолютное содержание регуляторных клеток (MDSCs+Treg), относительное содержание Т-клеток памяти в зависимости от формы патологии.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный 2-этапный алгоритм иммунологического обследования рекомендуется для использования в педиатрической практике для прогноза эффективности биологической терапии и определения тактики ведения пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и рассеянным склерозом.

2. До инициации биологической терапии пациентам с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и рассеянным склерозом рекомендовано проведение иммунологического обследования с определением соотношения Th17 лимфоцитов и регуляторных Т-клеток (индекса Th17/Treg), активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в Treg для выделения пациентов группы риска по недостаточному ответу на ГИБП.

3. Пациентам с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и рассеянным склерозом во время поддерживающего курса биологической терапии целесообразно проведение комплекса основных (соотношения Th17/Treg, активности сукцинатдегидрогеназы в Treg) и уточняющих тестов (абсолютного содержания миелоидных клеток супрессоров и регуляторных Т-клеток; содержания Т-регуляторных клеток с экспрессией эктонуклеотидазы CD39; субпопуляций Т-клеток памяти) разработанного алгоритма иммунологического обследования для оценки эффективности терапии и своевременной коррекции.

4. Пациентам с воспалительными заболеваниями кишечника после индукционного курса целесообразно проведение проактивного (непосредственно перед следующей инъекцией препарата) и реактивного (при обострении заболевания) терапевтического лекарственного мониторинга остаточного уровня блокаторов TNF и антилекарственных антител к ним для достижения стойкой клинической и эндоскопической ремиссии.

5. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, вульгарным псориазом и рассеянным склерозом рекомендовано проведение теста по оценке относительного содержания клеток с транслокацией ядерного фактора κВ в НК-клетках, превышение пороговых значений которого прогнозирует активацию воспалительного процесса и может использоваться в качестве быстрого теста для мониторинга текущего состояния.

6. Для мониторинга активности патологического процесса при лечении ГИБП у детей с болезнью Крона, язвенным колитом, вульгарным псориазом и рассеянным склерозом рекомендовано проведение теста по оценке количества клеток с транслокацией ядерного фактора κВ в НК-клетках, превышение пороговых значений которого прогнозирует усиление воспалительной реакции.

7. Пациентам с воспалительными заболеваниями кишечника и псориазом, получающим терапию блокаторами TNF, целесообразно назначение дополнительных иммунодепрессантов (азатиоприн, метотрексат) для повышения эффективности лечения, при этом длительность применяемой комбинированной терапии у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника не должна превышать 2-х лет, а у детей с псориазом – 3-х лет.

8. При выборе блокаторов TNF для лечения детей с болезнью Крона в возрастной группе старше 12 лет для увеличения выживаемости терапии целесообразно назначение инфликсимаба.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Алгоритм иммунологического обследования в будущем может быть дополнен исследованием двойной популяция Th17/Th1, обладающей более патогенными свойствами по сравнению с классическими Th17-лимфоцитами (высокая продукция провоспалительных цитокинов, интенсивно пролиферирующие клетки, устойчивы к действию Treg) для оценки тяжести состояния пациента и прогноза эффективности биологической терапии.

2. В качестве перспективных прогностических биомаркеров рассматриваются также Th1/Th2/Th17 – подобные Treg клетки, которые дифференцируются из классических Treg под действием транскрипционных факторов (mTOR, GATA3, IRF4, NIF-1a). Неклассические Treg клетки, с одной стороны, экспрессируют факторы транскрипции и хемокины свойственные Th1/Th2/Th17-лимфоцитам и ингибируют их функцию при воспалении. С другой стороны, при избыточной стимуляции неклассические Treg могут терять супрессивные свойства и усиливать воспаление, опосредованное Th1/Th2/Th17-лимфоцитами.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Оригинальные научные статьи в журналах

1. Показатели популяционного состава лимфоцитов как предикторы эффективности терапии ингибитором TNF $\alpha$  у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / С.В. Петричук, Л.В. Мирошкина, Е.Л. Семикина, А.П. Топтыгина, А.С. Потапов, Е.Г. Цимбалова, **Т.В. Радыгина** // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20. – №5. – С. 721-730. [Scopus]

2. Эффективность инфликсимаба у детей с ВЗК в зависимости от уровня циркулирующих цитокинов и концентрации препарата / **Т.В. Радыгина**, А.С. Илларионов, Д.Г. Герасимова, А.О. Анушенко, Ю. А. Комах, А. С. Потапов, С. В. Петричук, А. П. Фисенко // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. – №13. – С. 1531-1533. [RSCI]

3. Показатели клеточного иммунитета и клетки-супрессоры миелоидного происхождения у детей с псориазом/ Д.Г. Купцова, **Т.В. Радыгина**, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2020. – №3. – С.55-65. [RSCI]

4. Терапевтический лекарственный мониторинг адалимумаба при воспалительных заболеваниях кишечника у детей / А.С. Илларионов, **Т.В. Радыгина**, А.С. Потапов, А.П. Фисенко, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, А.Н. Сурков, М.Г. Вершинина // Вопросы детской диетологии. – 2021. – Т. 19. – №3. – С. 14-25. [Scopus]

5. Значение мониторинга уровня инфликсимаба и антител к нему в сыворотке крови для оптимизации терапии воспалительных заболеваний кишечника у детей / А.С. Илларионов, А.С. Потапов, С.В. Петричук, А.П. Фисенко, **Т.В. Радыгина**, Д.Г. Купцова, А.Н. Сурков, Т.Н. Коноплёва // Вопросы практической педиатрии. – 2021. – Т. 16. – №2. – С. 14-21. [Scopus]

6. Оценка эффективности анти-TNF терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями по активности NF- $\kappa$ B в популяциях лимфоцитов / С.В. Петричук, **Т.В.**

**Радыгина, Д.Г.** Купцова, О.В. Курбатова, Е.Л. Семикина, Н.Н. Мурашкин, А.С. Потапов, А.П. Фисенко // Российский иммунологический журнал. – 2022. – Т. 4. – №. 25. – С. 491-498. [RSCI]

7. Оценка количества субпопуляций CD4<sup>+</sup> клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у детей с псориазом / Д.Г. Купцова, **Т.В. Радыгина**, С.В. Петричук, Н.Н. Мурашкин, А.А. Хотко, Р.А. Иванов // Медицинская иммунология. – 2022. – №3. – Т. 24. – С. 587-596. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-AOC-2487>. [Scopus, RSCI]

8. Активность ядерного фактора транскрипции κВ в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом / Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, Н.Н. Мурашкин, О.В. Курбатова, **Т.В. Радыгина**, А. А. Хотко, Р.А. Иванов // Вестник РГМУ. – 2022. – №2. – С. 30–38. [Scopus, Web of Science]

9. Экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у условно здоровых детей / **Т.В. Радыгина**, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, Е.Л. Семикина, А.П. Фисенко // Российский иммунологический журнал. – 2022. – Т. 3. – № 25. – С. 283-290. [RSCI]

10. Использование лекарственного мониторинга инфликсимаба и адалимумаба для оптимизации терапии воспалительных заболеваний кишечника у детей / **Т.В. Радыгина**, А.С. Илларионов, С.В. Петричук Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, А.П. Фисенко, А.С. Потапов, Е.Л. Семикина, А.О. Анушенко // Российский педиатрический журнал. – 2022. – Т. 25. – № 5. – С. 313-320. [RSCI]

11. Содержание субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток памяти и уровень циркулирующих цитокинов при псориазе у детей/ Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, Н.Н. Мурашкин, **Т. В. Радыгина**, О.В. Курбатова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2022. – №3. – Т.19. – С. 163-172.

12. Содержание CD4<sup>+</sup>-клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39/CD73 у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / **Т. В. Радыгина**, С.В. Петричук, Д. Г. Купцова А.С. Потапов, А.С. Илларионов, А.О. Анушенко, О.В. Курбатова, Е.Л. Семикина // Вестник РГМУ. – 2022. – №. 4. – С. 19-26. [Scopus, Web of Science]

13. Уровни циркулирующих цитокинов у детей с рассеянным склерозом при разной эффективности интерфероновой терапии / **Т.В. Радыгина**, С.В. Петричук, О.В. Курбатова, Д.Г. Купцова, А.П. Фисенко, Е.Л. Семикина, Е.В. Фрейдлин, Л.М. Абдуллаева, Б.И. Бурсагова // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2023. – № 4. – С. 31-39.

14. Определение ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями / **Т.В. Радыгина**, С.В. Петричук, О.В. Курбатова, Д.Г. Купцова, А.С. Потапов // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2023. – № 2. – С. 54-56.

15. Изменения цитокиновых комплексов у детей с аутоиммунными заболеваниями при разной эффективности их биологической терапии / **Т.В. Радыгина**, А.П. Фисенко, С.В. Петричук, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, Е.В. Фрейдлин, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Б.И. Бурсагова, Л.М. Абдуллаева, Е.Л. Семикина // Российский педиатрический журнал. – 2023. – Т. 26. – №. 6. – С. 390-398. [RSCI]

16. Содержание миелоидных клеток-супрессоров при аутоиммунных заболеваниях у детей / **Т.В. Радыгина**, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Л.М.

Абдуллаева, О.В. Курбатова, В.С. Цветкова // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т. 3. – №. 26. – С. 381-388. [RSCI]

17. Оценка функциональной активности эктонуклеотидазы CD39+ в регуляторных Т-клетках у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / **Т.В. Радыгина**, Е.Г. Сорокина, С.В. Петричук, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, А.С. Потапов, С.А. Афанасьева // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 2. – № 25. – С. 415-422. [Scopus, RSCI]

18. Петричук С.В. Метаболизм популяций лимфоцитов у здоровых детей и пациентов с иммунозависимыми заболеваниями / С.В. Петричук, О.В. Курбатова, Д.Г. Купцова, **Т.В. Радыгина**, Е.В. Фрейдлин // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2023. – № 2. – С. 54-56.

19. Координация сигнального пути NF-κB и метаболизма лимфоцитов у детей с аутоиммунными заболеваниями / О.В. Курбатова, **Т.В. Радыгина**, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, Г.Б. Мовсисян, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Л.М. Абдуллаева, А.П. Фисенко // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т.4. – № 26. – С. 491-500. [RSCI]

20. Роль клеток-супрессоров миелоидного происхождения в прогнозе эффективности генно-инженерных биологических препаратов у детей с псориазом / Д.Г. Купцова, **Т.В. Радыгина**, Е.В. Фрейдлин, О.В. Курбатова, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Российский иммунологический журнал. – 2023. – №3. – Т. 26. – С. 329-336. [RSCI]

21. Содержание субпопуляций CD4+Т-клеток в прогнозе эффективности биологической терапии псориаза у детей/ Д.Г. Купцова, **Т.В. Радыгина**, О.В. Курбатова, А.И. Материкин, Р.В. Епишев, Л.А. Опрятин, А.А. Хотко, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 5. – № 25. – С. 1071-1078. [Scopus, RSCI]

22. Особенности показателей клеточного иммунитета в зависимости от активности очагов демиелинизации у детей с рассеянным склерозом / **Т.В. Радыгина**, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, С.В. Петричук, Е.Л. Семикина, А.П. Фисенко, Л.М. Абдуллаева, Б.И. Бурсагова // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25 – № 5. – С. 1019-1026. [Scopus, RSCI]

23. Метаболизм лимфоцитов и уровень циркулирующих цитокинов у детей с аутоиммунными заболеваниями / **Т. В. Радыгина**, О.В. Курбатова, Д. Г. Купцова, С.В. Петричук, А.П. Фисенко, Г.Б. Мовсисян, Л.М. Абдуллаева, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Д.В. Парахина // Медицинская иммунология. – 2024. – Т. 5. – № 26. – С. 1017-1024. 4. [Scopus, RSCI]

24. Выживаемость биологической терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями / **Т.В. Радыгина**, С.В. Петричук, А.П.Фисенко, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, Л.М. Абдуллаева, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Л. М. Кузенкова, Е.Л. Семикина // Российский педиатрический журнал. – 2024. – Т. 27. – №. 5. – С. 322 –330. [RSCI]

25. Содержание Т-клеток памяти у детей с иммунозависимыми заболеваниями при разной эффективности биологической терапии / **Т.В. Радыгина**, С.В. Петричук, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, А.П. Фисенко, Л.М. Абдуллаева, Е.В. Фрейдлин, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Л. М. Кузенкова, Е.Л. Семикина // Российский педиатрический журнал. – 2025. – Т. 1. – №. 28. – С. 23-32. [RSCI]

26. Алгоритм иммунологического обследования детей с иммунозависимыми заболеваниями для прогноза эффективности биологической терапии / **Т. В. Радыгина**, С.В. Петричук, А.П. Фисенко, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, А.О. Анушенко, Л.А. Опрятин, Л.М. Абдуллаева, Е.В. Фрейдлин, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Л.М. Кузенкова // Российский педиатрический журнал. – 2025. – Т. 28. – №. 6. – С. 408-419.

#### Публикации в периодической научной печати

27. Особенности содержания цитокинов и хемокинов в сыворотке крови у детей с вульгарным псориазом / Д.Г. Купцова, **Т.В. Радыгина**, Н.Н. Мурашкин, Е.В. Фрейдлин, О.В. Курбатова, С.В. Петричук // Цитокины и воспаление. – 2023. – №1. – Т. 20. – С. 18-24.

28. Перспективы изучения иммунометаболизма в клинической практике / О.В. Курбатова, Д.Г. Купцова, Р.Ш. Закиров, **Т.В. Радыгина**, Г.Б. Мовсисян, Е.В. Фрейдлин, Е.Л. Семикина, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Вестник Ташкентской медицинской академии. – 2023. – Т 3. – №. 1. – С. 98-104.

#### Патенты

29. Патент № 2302635, RUS Авторы: Петричук С. В., Измайлова Т. Д., **Радыгина Т. В.** Способ измерения митохондриальной активности лимфоцитов. Заявитель и патентообладатель ГУ Научный центр здоровья детей РАМН. – № 2005141145; заявл. 28.12.2005; опубл. 10.07.2007.

#### Материалы конференций по теме диссертационного исследования

30. Информативность определения клеток супрессоров миелоидного происхождения для оценки тяжести состояния детей с псориазом / Д.Г. Герасимова, О.В. Курбатова, И.В. Самохина, **Т.В. Радыгина**, Р.Ш. Закиров, С.В. Петричук // Лабораторная служба. – 2017. – Т.6. – №3. – С.56-57.

31. Прогноз эффективности биологической терапии при ВЗК у детей на основании определения метаболической активности лимфоцитов / С.В. Петричук, Л.В. Мирошкина, О.В. Курбатова, Р.Ш. Закиров, **Т.В. Радыгина**, И.В. Самохина, Е.Г. Цимбалова // Лабораторная служба. – 2017. – Т6, №3. – С. 60-61.

32. Клетки-супрессоры миелоидного происхождения у детей с псориазом / Д.Г. Герасимова, Р.Ш. Закиров, **Т.В. Радыгина**, О.В. Курбатова, И.В. Самохина, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Материалы XVI Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». Медицинская иммунология. Санкт-Петербург – 2017. – Т.19. – №S. – С.155.

33. Myeloid-derived suppressor cells in children with severe psoriasis / D. Gerasimova, T. **Radygina**, N. Murashkin, A. Toptygina, S. Petrichuk // Abstract book: 5th European Congress of Immunology. Amsterdam – 2018. – P.361.

34. Иммунометаболизм популяций Т-хелперов у детей с псориазом / Д.Г. Герасимова, **Т.В. Радыгина**, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук // Лабораторная служба. – 2018. – Т.7. – №3(2). – С.152.

35. Иммунологические предикторы неэффективности биологической терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / **Т.В. Радыгина**, А.С. Илларионов, Д.Г.

Герасимова, А.О. Анушенко, Ю.А. Комах, А.С. Потапов, С.В. Петричук, А.П. Фисенко // Материалы научно-практических конференций 5-го Российского конгресса лабораторной медицины. Москва – 2019. – С.28-29.

36. The level of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) translocation during infliximab therapy in children with IBD. / S. Petrichuk, **T. Radigina**, D. Gerasimova, A. Illarionov, A. Anushenko, T. Erlikh-Fox, A. Potapov // Journal of Crohns and Colitis – 2019. – Vol. 13. – No. S1. – P. S120-S121. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jyy222.194>. [Scopus, Web of Science]

37. Laboratory criteria of infliximab therapy inefficiency in children with IBD / A Potapov, **T Radygina**, S Petrichuk, D Gerasimova // Journal of Crohn's and Colitis – 2019 – Vol. 13. – No. S1. – P. S285. [Scopus, Web of Science]

38. Особенности клеточного иммунитета при псориазе у детей / Д.Г. Купцова, Н.Н. Мурашкин, **Т.В. Радыгина**, С.В. Петричук // Материалы XXV Всероссийской научно-практической конференции. Лабораторная служба. Москва – 2020 – Т.9. – №1. – С.39-40. Радыгина, Т.В.

39. Expression of CD39 ectonucleotidase on regulatory T cells and on T helper 17 cells in children with IBD receiving anti-TNF therapy / S. V. Petrichuk, **T. Radygina**, A. Illarionov, D. Kuptsova, A. Potapov, A. P. Fisenko // Journal of Crohns and Colitis. – 2020. – Vol. 14. – No. S1. – P. S558-S559. [Scopus, Web of Science]

40. NF- $\kappa$ B as a prognostic marker of response to biologic therapy in children with IBD / **T.Radigina**, A. Illarionov, D. Kuptsova, A. Potapov, S. Petrichuk, A.P. Fisenko // Journal of Crohns and Colitis. –2020. – Vol. 14. – No. S1. – P. S386-S387. [Scopus, Web of Science]

41. Определение остаточного уровня адалимумаба для оценки эффективности анти-TNF-терапии у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / **Т.В. Радыгина**, Д.Г. Купцова, А.С. Илларионов, А.О. Анушенко, О.В. Курбатова, А.С. Потапов, Е.Л. Семикина, С.В. Петричук, А.П.Фисенко // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Осенние Филатовские чтения – важные вопросы детского здоровья». Российский педиатрический журнал. Смоленск – 2022. –Т. 25. – № 4. – С. 281.

42. The role of purinergic signaling (CD39/CD73) in children with IBD. / **T. Radigina**, A Potapov, D. Kuptsova, A. Illarionov, S. Petrichuk // ESPGHAN 54th Annual Meeting Abstracts – Copenhagen – 2022. – Vol. 74 (Supplement 2). – P 582. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003446>

43. Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 как предикторы эффективности анти-TNF терапии у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника / **Т.В. Радыгина**, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, А.С. Потапов, А.С. Илларионов, Е.Л. Семикина, А.П. Фисенко //Материалы научно-практических конференций в рамках VIII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2022). Сборник тезисов. Москва – 2022. – С. 21 -22.

44. Метаболизм лимфоцитов и активность NF- $\kappa$ B при псориазе у детей / Д.Г. Купцова, Н.Н. Мурашкин, **Т.В. Радыгина**, О.В. Курбатова, С.В. Петричук // Материалы научно-практических конференций в рамках VIII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2022). Сборник тезисов. Москва – 2022. – С. 21.

45. Активность фактора транскрипции NF-κB и метаболизм лимфоцитов при различных заболеваниях у детей / С.В. Петричук, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, **Т.В. Радыгина**, Г.Б. Мовсисян, Е.В. Фрейдлин / В книге: Научные лабораторные технологии для клинической медицины. Материалы XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под редакцией В. В. Долгова. Москва – 2023. – С. 136-138.

46. Применение метода проточной цитометрии с визуализацией в оценке эффективности ГИБП у детей с псориазом // Д.Г. Купцова, **Т.В. Радыгина**, О.В. Курбатова, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук / В книге: Научные лабораторные технологии для клинической медицины. Материалы XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под редакцией В. В. Долгова. Москва – 2023. – С. 98-99.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛА – антилекарственные антитела

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ПС – псориаз

РС – рассеянный склероз

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг

ЯК – язвенный колит

ADA (adalimumab) – адалимумаб

BSA (body surface area) – индекс площади поражения тела (при псориазе)

CD39 – эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1

CD73 (Ecto5'NTase-ecto-5'-nucleotidase) – экто-5'-нуклеотидаза

EDSS (Expanded Disability Status Scale) – расширенная шкала инвалидизации

INFβ-1a – интерферон бета-1a

IFX – инфликсимаб

MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) – клетки-супрессоры миелоидного происхождения

NF-κB (nuclear factor κB) – ядерный фактор транскрипции κB

OXPPOS (oxidative phosphorylation) – окислительное фосфорилирование

PASI (psoriasis area severity index) – индекс площади и тяжести псориаза

PCDAI (Pediatric Crohn Disease Activity Index) – педиатрический индекс активности болезни Крона

PUCAI (Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index) – педиатрический индекс активности язвенного колита